

UNIVERSITÉ DE PARIS  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année 1942-43 — N° 71 — Série U

---

RECHERCHES  
SUR LA  
PHOSPHATASE URINAIRE

Contribution à l'étude de l'emploi  
de l'acide periodique en chimie analytique biologique

---

THÈSE  
pour l'obtention du diplôme de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS  
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement le 5 Avril 1943

PAR

PIERRE BIGET

PHARMACIEN,

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS,  
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS,  
ANCIEN MONITEUR DES TRAVAUX PRATIQUES DE 4<sup>e</sup> ANNÉE  
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

---

JURY { MM. HERISSEY, Président.  
FLEURY, Professeur.  
GUILLOT, Maître de Conférences.

LE MANS

1943



# FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

---

Nom du Candidat : **BIGET.**

Prénom : **Pierre.**

---

Date de soutenance : .....

Numéro d'ordre : .....

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque)

**BIGET (Pierre).** — Recherches sur la phosphatase urinaire. — Le Mans, Imp. Jouen, 1943, *in-8°*, 108 p., 13 fig.

(Th. Pharm. Doc. Univ. Paris, 1943, Série U, n° 71).

**BIGET (Pierre).** — Recherches sur la phosphatase urinaire. — Le Mans, Imp. Jouen, 1943, *in-8°*, 108 p., 13 fig.

(Th. Pharm. Doc. Univ. Paris, 1943, Série U, n° 71).

**BIGET (Pierre).** — Recherches sur la phosphatase urinaire. — Le Mans, Imp. Jouen, 1943, *in-8°*, 108 p., 13 fig.

(Th. Pharm. Doc. Univ. Paris, 1943, Série U, n° 71).

**BIGET (Pierre).** — Recherches sur la phosphatase urinaire. — Le Mans, Imp. Jouen, 1943, *in-8°*, 108 p., 13 fig.

(Th. Pharm. Doc. Univ. Paris, 1943, Série U, n° 71).



UNIVERSITÉ DE PARIS  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année 1942-43 — N° 71 — Série U

---

RECHERCHES  
SUR LA  
PHOSPHATASE URINAIRE

Contribution à l'étude de l'emploi  
de l'acide periodique en chimie analytique biologique

---

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS  
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement le 5 Avril 1943

PAR

PIERRE BIGET

PHARMACIEN,

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS,  
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS,  
ANCIEN MONITEUR DES TRAVAUX PRATIQUES DE 4<sup>e</sup> ANNÉE  
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS.

---

JURY { MM. HERISSEY, Président.  
FLEURY, Professeur.  
GUILLLOT, Maître de Conférences.

LE MANS

---

1943

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

## ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, ☼ I.  
HERISSEY, *Assesseur*, ✱, ☼ I.  
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, ☼ I.

MM.

## PROFESSEURS

|                           |                                                                   |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| DAMIENS, O. ✱, ☼ I. ....  | Chimie minérale.                                                  |
| HERISSEY, O. ✱, ☼ I. .... | Chimie biologique.                                                |
| SOMMELET, ✱, ☼ I. ....    | Chimie organique.                                                 |
| FABRE, ✱, ☼ I. ....       | Toxicologie.                                                      |
| LAUNOY, O. ✱, ☼ I. ....   | Zoologie.                                                         |
| DELABY, ✱, ☼ I. ....      | Pharmacie chimique.                                               |
| PICON, ✱, ☼ I. ....       | Physique.                                                         |
| MASCRÉ, ✱, ☼ I. ....      | Histoire naturelle des médicaments simples<br>d'origine végétale. |
| BACH, ✱, ☼ I. ....        | Botanique.                                                        |
| FLEURY, ☼ I. ....         | Chimie analytique.                                                |
| REGNIER, ☼ I. ....        | Microbiologie.                                                    |
| JANOT, ☼ A. ....          | Pharmacie galénique.                                              |

*Doyens honoraires* : M. RADAIS, O. ✱, ☼ I. — GUÉRIN, O. ✱, ☼ I.

## *Professeurs honoraires* :

DELEPINE, O. ✱, ☼ I., LEBEAU, O. ✱, ☼ I., Membres de l'Institut,  
PERROT, C. ✱, ☼ I., COUTIERE, O. ✱, ☼ I., BOUGAULT, O. ✱, ☼ I.  
LUTZ, ☼, ✱, I et GORIS, O. ☼, ✱, I

## MAITRES DE CONFÉRENCES

|                         |                                                                 |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| MM. BEDEL, ✱, ☼ I. .... | Minéralogie et Législation et Déontologie<br>pharmaceutiques.   |
| CHARONNAT, ☼ I. ....    | Hydrologie et Hygiène.                                          |
| VALETTE, ☼ A. ....      | Cryptogamie et technique microbiologi-<br>que. Pharmacodynamie. |
| FONTAINE .....          | Histoire naturelle.                                             |
| GUILLOT .....           | Sciences physiques et chimiques.                                |
| PARIS .....             | Sciences naturelles.                                            |

## CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

|                                                                                    |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| MM. DOMANGE, ☼ A. Travaux pratiques de<br>1 <sup>re</sup> année .....              | Chimie générale et<br>pharmaceutique |
| GAUTIER, ☼ A. Travaux pratiques de 2 <sup>e</sup><br>et 3 <sup>e</sup> année ..... | Chimie analytique.                   |
| N .....                                                                            | Micrographie.                        |
| CORRIEZ, ☼ A. ....                                                                 | Physique.                            |
| DAVID, ☼ I. ....                                                                   | Microbiologie.                       |
| COURTOIS .....                                                                     | Chimie biologique.                   |
|                                                                                    | Bromatologie et                      |
|                                                                                    | Pharmacie chimique.                  |

*Bibliothécaire en Chef* : M. GARNIER, ☼ A.

*Bibliothécaire* : Mlle LAVAUD, ☼ A.



À MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HERISSEY

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,  
PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,  
PHARMACIEN HONORAIRE DES HÔPITAUX DE PARIS,  
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

*Hommage de respectueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,  
PHARMACIEN-CHEF DES HÔPITAUX PSYCHIATRIQUES DE LA SEINE.

*En témoignage de respectueuse gratitude.*

A MONSIEUR M. GUILLOT,

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,  
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS.

*Respectueux hommage.*

A MONSIEUR J. COURTOIS,  
CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ.  
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS,

*En témoignage de reconnaissance pour  
tous les conseils qu'il n'a cessé de nous  
prodiguer.*

A MA FEMME.

— MEIS ET AMICIS —

## INTRODUCTION

---

Diverses diastases, la lipase et l'amylase, entre autres ont été retrouvées dans l'urine, elles s'y rencontrent fréquemment sinon d'une façon constante. L'urine semble également renfermer d'une façon normale des phosphatases. Nous nous sommes proposés d'étudier l'activité phosphatasique urinaire. Les techniques habituelles de recherche des phosphatases dosent l'acide phosphorique libéré des esters phosphoriques; l'urine renfermant normalement des phosphates, il faut donc soustraire le phosphore minéral préexistant du phosphore minéral après hydrolyse phosphatasique.

Nous avons cherché à tourner la difficulté en utilisant comme substrat du  $\beta$  glycérophosphate; ce corps non oxydable par l'acide periodique est hydrolysé en acide phosphorique et glycérol oxydable par l'acide periodique. Nous avons donc cherché à estimer l'activité phosphatasique en dosant par oxydation periodique le glycérol libéré; dans ce but, nous avons effectué des recherches préliminaires ayant pour but de résoudre deux problèmes que posait ce dosage.

1) Divers faits expérimentaux pouvaient laisser croire qu'il existait une diastase transformant le  $\beta$  glycérophosphate en  $\alpha$  qui, lui est oxydable par l'acide periodique. FLEURY et PARIS [45].

Nous avons donc recherché cette mutase éventuelle; pour ce faire, nous avons dû mettre au point une technique analytique de recherche de l' $\alpha$  glycérophosphate dans un milieu complexe. Nous avons pu le doser en l'oxydant en diosephosphate déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin.

En utilisant cette technique, nous n'avons jamais pu déceler de mutase des glycérophosphates aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal.

2) Nous avons étudié l'action de l'acide periodique sur l'urine, nous avons observé que l'urine normale réduisait ce réactif. L'action de divers agents précipitants a montré que la majeure partie de cette action réductrice devait être rapportée aux substances glucidiques mal connues de l'urine normale.

Ayant mis au point la technique de mesure de la phosphatase urinaire, nous avons suivi son élimination. Nous avons opéré soit directement sur l'urine, soit sur la diastase relarguée par le sulfate d'Ammonium. Avec la diastase relarguée nous avons déterminé les principales caractéristiques de la phosphatase urinaire: activité en fonction du pH, influence des sels de Magnésium, action sur les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates. Nos essais nous ont montré qu'aux différentes heures de la journée, chez

l'homme comme chez la femme, nous retrouvions une phosphatase ayant les mêmes caractères ; la diastase urinaire peut-être classée dans le groupe A<sub>2</sub> de FOLLEY et KAY [48].

Enfin, nous avons estimé l'activité phosphatasique urinaire dans la maladie de PAGET, maladie où on observe une très forte augmentation de la phosphatase A<sub>1</sub> du Sang. Nous n'avons observé aucune apparition de phosphatase A<sub>1</sub> dans l'urine et aucune variation de la teneur de l'urine en phosphatase A<sub>2</sub>.

Nous exprimons notre respectueuse gratitude à M. le Professeur HÉRISSEY qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse ; nous tenons à exprimer notre respectueuse gratitude à M. le Professeur FLEURY qui a bien voulu nous inscrire au nombre de ses élèves et nous conseiller au cours de nos recherches ; nous adressons également tous nos remerciements à M. GUILLOT, maître de conférences, qui avait bien voulu nous confier un poste de moniteur aux Travaux Pratiques et qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury de Thèse.

Nous prions M. COURTOIS, chef de travaux, qui nous a confié le sujet de ce travail, de bien vouloir accepter l'expression de nos sentiments de respectueuse reconnaissance et de croire à l'assurance de notre affectueux et profond attachement. Nous ne saurions oublier les cinq années passées dans son laboratoire et les précieux conseils qu'il nous a prodigués sans compter.

Nous remercions Mme le Docteur BERTRAND-FONTAINE et M. le Docteur DECOURT, médecins des Hôpitaux, de l'indulgent intérêt dont ils nous ont toujours entourés pendant notre internat.

Nous adressons à M. le Docteur SOUPAULT, chirurgien des Hôpitaux, nos sentiments très reconnaissants pour l'accueil aimable qu'il nous a toujours réservé dans son service.

Nous exprimons notre gratitude au Conseil de la Faculté qui nous a accordé une subvention pendant notre travail.

---

## PLAN DU TRAVAIL

---

### INTRODUCTION.

### PREMIÈRE PARTIE. — Recherche d'une mutase des glycéro-phosphates.

#### INTRODUCTION.

*Chapitre I.* — Mise au point d'une technique de Recherche.

*Chapitre II.* — Recherche de la mutase.

### DEUXIÈME PARTIE. — Etude de la phosphatase urinaire.

*Chapitre I.* — Historique.

*Chapitre II.* — Action de l'acide periodique sur l'urine.

*Chapitre III.* — Technique de mesure de l'activité phosphatasique urinaire.

*Chapitre IV.* — Etude directe de la phosphatase urinaire.

*Chapitre V.* — Propriétés générales des divers échantillons de phosphatase urinaire relarguée.

*Chapitre VI.* — La phosphatase urinaire dans la maladie de PAGET.

### CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

### BIBLIOGRAPHIE.

### TABLE DES MATIÈRES.

---



## PREMIÈRE PARTIE

---

# Recherche d'une mutase des Glycérophosphates

---

### INTRODUCTION.

---

De multiples diastases peuvent agir sur les esters phosphoriques phosphatases, deshydrogénases, aldolase et mutases COURTOIS [22]. Deux de ces mutases ont une action tout à fait remarquable : elles font émigrer la liaison ester sur un autre atome de carbone. Ces diastases sont la phosphoglycéro-mutase de MEYERHOF et KIESSLING [71] qui isomérisé réversiblement l'acide phospho-3-glycérique en acide phospho-2-glycérique et la phospho-glucomutase de CORI et COLOWICK [15] qui transforme irréversiblement le phospho-1-glucopyranose (ester de CORI) en phospho-6-glucopyranose (ester de ROBISON).

Nous nous sommes proposés de rechercher s'il existait une mutase similaire des  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates. Divers faits pouvaient en effet, être interprétés en faisant intervenir une telle mutase.

MEYERHOF et ses collaborateurs [74]-[70] ont montré que par suite d'une oxydo-réduction fermentaire entre les acides  $\alpha$ -glycérophosphorique et pyruvique apparaissaient les acides dioxyacétonephosphorique et lactique. L'acide  $\beta$ -glycérophosphorique ne peut remplacer son isomère dans cette oxydo-réduction. Par la suite GODA [49] effectua de nouvelles recherches dans le laboratoire de MEYERHOF. Il observa que certaines préparations fermentaires du muscle pouvaient oxyder l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique en présence d'acide pyruvique. GODA supposa qu'une mutase des glycérophosphates intervenait dans cette réaction, il ne put toutefois la mettre en évidence.

Le  $\beta$ -glycérophosphate ne possédant pas de fonction glycol- $\alpha$  n'est pas oxydable à froid par l'acide periodique, tandis que l' $\alpha$ -glycérophosphate renferme une fonction glycol- $\alpha$  oxydable par l'acide periodique. P. FLEURY et R. PARIS [45].

GODA mit en contact l'extrait de muscle dialysé et le  $\beta$ -glycérophosphate, il ne put ainsi déceler l'apparition d'une substance oxydable par l'acide periodique.

J. COURTOIS [20]-[21] a étudié l'action synthétisante en milieu glycérolé des phosphatases du rein de Porc et des graines d'Amande douce. Dans les deux cas, le glycérophosphate formé a été isolé ; il est constitué presque exclusivement de l'isomère  $\alpha$ . D'autre part, l'hydrolyse en milieu glycérolé soit de l' $\alpha$ , soit du  $\beta$ -glycérophosphate conduit au même équilibre final que la synthèse. Cependant, tandis qu'à l'équilibre l' $\alpha$ -glycérophosphate n'est pas modifié, le  $\beta$  est partiellement transformé en  $\alpha$ . Deux hypothèses permettent d'interpréter cette transposition :

a) hydrolyse plus accentuée du  $\beta$ -glycérophosphate que ne l'indique la libération de phosphore, une partie de l'acide phosphorique se combinant au glycérol et synthétisant de l' $\alpha$ -glycérophosphate de façon à maintenir constant l'équilibre.

glycérol + phosphates  $\rightleftharpoons$  glycérophosphates.

b) Intervention d'une mutase des glycérophosphates. Si cette mutase existe elle n'accompagne pas toujours les phosphatases. Au cours de ses recherches sur les phosphatases végétales, J. COURTOIS [18] a suivi l'hydrolyse des  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates en dosant d'une part l'acide phosphorique libéré et d'autre part le glycérol libéré (par oxydation periodique).

L'isomérisation du  $\beta$ -glycérophosphate non oxydable par l'acide periodique en son isomère  $\alpha$  oxydable augmente la consommation en acide periodique qui oxyde donc à la fois le glycérol libéré et l' $\alpha$ -glycérophosphate. Les dosages de glycérol et acide phosphorique libres donnent des résultats concordants : les hydrolyses par la Taka-diaстase, les graines de Moutarde (blanche et noire) d'Amande douce, de Pavot et de Haricot ne sont pas perturbées par une mutase. L'existence de cette mutase apparaît peu probable, nous avons cependant effectué des recherches complémentaires sur cette question.

---

## CHAPITRE PREMIER.

---

### MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE RECHERCHE.

---

Une méthode de principe assez simple, était la suivante : dosage par l'acide periodique de l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique formé à partir de son isomère  $\beta$ . Cette technique est parfaite en milieu défini et Mlle M.C. BAILLY [3] l'a utilisée pour démontrer que par chauffage en milieu acide, l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique se transposait en acide  $\alpha$ , la réaction est réversible mais l'équilibre nettement en faveur de la forme  $\alpha$ .

Les milieux biologiques, renferment des substances oxydables par l'acide periodique (acides-alcools glucides, etc.), qui sont parfois lentement oxydables comme J. COURTOIS [17]-[19] l'a observé avec la Taka-diastrase. De ce fait, la technique à l'acide periodique exigera donc la soustraction d'un terme correctif souvent important et d'une détermination délicate (l'oxydabilité de certains corps complexes variant avec le pH, la température, la durée de la réaction). Nous avons donc complété cette technique de façon à remplacer le dosage par différence par un dosage direct. Nous dosons le diosephosphate (hydroxyéthanal monorthophosphate).  $\text{PO}_3\text{H}_2 - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CHO}$  qui se forme par oxydation periodique de l' $\alpha$ -glycérophosphate. FLEURY et PARIS [45]. Nous avons tout d'abord tenté d'utiliser la grande labilité du diosephosphate en milieu acide FLEURY et COURTOIS [41] mais le  $\beta$ -glycérophosphate associé est faiblement hydrolysé. Nous avons alors étudié l'action des alcalis.

#### A) DOSAGE DE L' $\alpha$ -GLYCÉROPHOSPHATE PAR L'HYDROLYSE ACIDE DU DIOSEPHOSPHATE.

*Principe.* — Nous constituons un milieu synthétique analogue à celui que nous pouvons rencontrer dans nos recherches :  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphate, glycérol, phosphate.

Le phosphate est précipité par la mixture magnésienne, le filtrat concentré et acidifié est oxydé par l'acide periodique à la température ordinaire (à 100° le  $\beta$ -glycérophosphate isomérisé en  $\alpha$  est oxydé par l'acide periodique puis déphosphorylé. FLEURY et COURTOIS [42]). L'excès d'acide periodique est réduit par le glycérol et le diosephosphate hydrolysé par l'acide sulfurique, le phosphore minéral libéré est dosé après insolubilisation préalable en phosphate ammoniac-magnésien,

*Protocole opératoire.* — Nous constituons un mélange contenant 1 à 10 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$  ou  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10, 0,5 cm<sup>3</sup> de solution de glycérol M/2 et 10 cm<sup>3</sup> de solution de PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub>M/10. On ajoute alors 10 cm<sup>3</sup> de mixture magnésienne aux sulfates. On complète à 50 cm<sup>3</sup> dans une fiole jaugée avec de l'eau et quelques gouttes d'ammoniaque. On laisse 24 heures au repos ; au bout de ce temps, on filtre pour éliminer le phosphore minéral précipité. On recueille 40 cm<sup>3</sup> et on concentre au bain-marie pour éliminer l'excès d'ammoniaque. On verse dans une flacon jaugé de 50 cm<sup>3</sup>. On lave le récipient où on avait recueilli les 40 cm<sup>3</sup> avec 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique 2N et 30 cm<sup>3</sup> d'acide periodique M/20. On complète à 50 cm<sup>3</sup> ; après 30 minutes on ajoute 1 cm<sup>3</sup> de glycérol pour détruire l'excès d'acide periodique et 15 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 20 % en volume.

On plonge 1 heure 30 dans un bain-marie bouillant ; il y a libération interférente d'iode, après refroidissement le phosphore minéral est précipité par addition de mixture magnésienne et alcalinisation par l'ammoniaque. Le précipité recueilli est redissous dans l'acide nitrique et dosé par la technique de COPAUX [14].

Nos résultats (Tableau I) montrent que nous pouvons retrouver sous forme minérale la majeure partie du phosphore organique primitivement à l'état d' $\alpha$ -glycérophosphate.

Le  $\beta$ -glycérophosphate fournit cependant un peu de phosphore minéral.

Cette technique aurait pu être utilisée, mais nous avons préféré déphosphoryler le diosephosphate par le peroxyde d'hydrogène alcalin, car nous avons obtenu de meilleurs résultats dans ces conditions.

#### B) DOSAGE DE L' $\alpha$ -GLYCÉROPHOSPHATE PAR HYDROLYSE ALCALINE DU DIOSEPHOSPHATE.

Les esters monoorthophosphoriques des alcools gras ou éthyléniques et des polyols ne sont pratiquement pas saponifiés par les alcalis dilués.

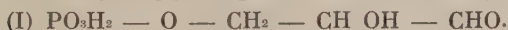
Dès 1898 CAVALIER [12] a montré que les sels des monoesters acides (méthylique, éthylique, allylique) sont pratiquement indécomposables en solution aqueuse ou alcaline même à 90°. Par la suite, PLIMMER et SCOTT [83] ont montré que le glycérophosphate résistait à l'action des alcalis. Enfin, FLEURY et SUTU [46] ont pu observer que les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates n'étaient pratiquement pas hydrolysés par la soude concentrée après une ébullition de huit heures. J. COURTOIS et DENIS [24] ont observé le même fait avec les n-propyl et isopropylorthophosphates,

TABLEAU I.

Dosage de l' $\alpha$ -glycérophosphate par hydrolyse acide du Diosephosphate.

| mg. de $P_2O_5$ organique<br>mis en œuvre |                           | mg. de $P_2O_5$<br>minéral dosé à la fin<br>des diverses<br>manipulations |
|-------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -glycérophosphate                | $\beta$ -glycérophosphate |                                                                           |
| 0                                         | 70                        | 1,2                                                                       |
| 7                                         | 63                        | 6,2                                                                       |
| 14                                        | 56                        | 12,5                                                                      |
| 14                                        | 70                        | 14,3                                                                      |
| 21                                        | 49                        | 18,75                                                                     |
| 28                                        | 42                        | 25,6                                                                      |
| 35                                        | 35                        | 32,5                                                                      |
| 42                                        | 28                        | 42,0                                                                      |
| 56                                        | 14                        | 60,0                                                                      |
| 63                                        | 7                         | 56,25                                                                     |
| 70                                        | 0                         | 65,0                                                                      |

Toutefois, certains esters, se sont révélés alcalino-labiles, ce sont ceux possédant un carbonyle aldéhydique ou cétonique libre : c'est ainsi que les triosephosphates qui sont les esters de l'aldéhyde glycérique (I) et de la dioxyacétone (II).



sont totalement décomposés par la soude normale en quelques minutes à la température ordinaire, l'acide phosphorique est mis en liberté et le triose donne de l'acide lactique MEYERHOF et LOHMANN [72]. FLEURY et COURTOIS [40] ont étudié l'action des alcalis sur le diosephosphate ; à  $100^\circ$  et à  $37^\circ$ , la soude normale libère  $PO_3H_2$ , cette libération atteint au maximum 50 % du phosphore total et la réaction n'est pas monomoléculaire.

Le  $\beta$ -glycérophosphate n'étant pas du tout déphosphorylé dans ces conditions, nous avons recherché, si en modifiant les conditions de température et d'alcalinité, il ne serait pas possible d'augmenter la déphosphorylation du diosephosphate. Nos essais ne nous ont jamais permis d'obtenir la libération totale du phosphore, les réactions qui s'effectuent apparaissent en effet assez complexes.

Comme alcalis, nous avons eu recours à la soude et à l'ammoniaque ; dans tous ces essais, 5 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$ -glycérophosphate sont oxydés par la quantité théorique d'acide periodique, la solution est ensuite additionnée d'une quantité variable d'alcali ; le phosphore minéral libéré est dosé par la technique de COPAUX après isolement préalable en phosphate ammoniaco-magnésien.

### 1. — *Essais avec la soude.*

a) avec une alcalinité N/10 dans le milieu, les pourcentages de déphosphorylation sont après contact à la température ordinaire 15 en 48 h. ; 40 en 5 jours et 20 jours ; à 40°, 20 en 24 h., 40 en 5 jours, 62 en 9 jours et 20 jours ; à 80°, 40 en 5 heures, 60 en 24 heures, 62 en 3 jours, 68 en 4 jours et 7 jours, 71 en 13 jours et 18 jours.

b) pour une alcalinité N à la température ordinaire 37 en 48 h., 42 en 5 jours et 18 jours.

c) pour une alcalinité 5N à la température ordinaire, 51 en 2 jours, 55 en 2 jours, 57 en 18 jours ; à 40° 62 en 24 heures, 57 en 4 jours, 68 en 9 jours, et 20 jours ; à 80°, 51 en 5 heures et 62 en 24 heures. Au delà de 24 heures à 80° il se forme un dépôt très abondant dans le flacon et le dosage de l'acide phosphorique devient impraticable.

En prolongeant le contact on arrive donc au maximum à une libération d'environ 70 % du phosphore, dans les diverses conditions la déphosphorylation cesse après une certaine durée de contact.

Avec une faible alcalinité N/10 et à 80° la libération du phosphore est plus lente mais plus complète qu'avec des alcalinités plus fortes.

### 2. — *Essais avec l'ammoniaque.*

a) avec une alcalinité N les pourcentages d'hydrolyse sont à la température ordinaire, 4 en 2 jours, 20 en 5 jours, 48 en 18 jours ; à 40°, 22 en 1 jour, 31 en 5 jours, 65 en 9 jours, 78 en 20 jours ; à 80°, 30 en 5 heures, 50 en 1 jour, 84 en 11 jours ; il se forme alors un abondant dépôt amorphe.

b) avec une alcalinité 5N, à 40°, 20 en 1 jour, 37 en 4 jours, 43 en 16 jours et 60 jours avec formation d'un très abondant dépôt.

Comme pour la soude avec une faible alcalinité la déphosphorylation est plus lente mais plus complète. Le meilleur résultat a été obtenu avec l'alcali le plus faible, 78 et 84 % du phosphore sont libérés en milieu ammoniacal.

Si l'on en juge par l'influence de la température et de la concentration en alcali la réaction de déphosphorylation paraît assez complexe ; nous avons fait quelques essais complémentaires qui le confirment : nous avons préparé du diosephosphate de baryum en suivant la technique indiquée par PARIS [81]. Le baryum a été éliminé par trituration avec de l'acide sulfurique dilué et la solution neutralisée. 150 cm<sup>3</sup> de cette solution de diosephosphate sont mis en contact avec

15 cm<sup>3</sup> de NaOH 2N à la température ordinaire, nous avons déterminé l'action mercuro-réductrice sur le réactif de NESSLER à la température ordinaire et le phosphore minéral libéré.

TABLEAU II.

Pouvoir mercuro-réducteur après un temps variable  
de contact avec l'alcali.

| Durée de contact avec l'alcali<br>(en jours)                                                         | 0    | 1   | 3    | 6   | 14   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|------|-----|------|
| cm <sup>3</sup> d'aldéhydes M/20 dosés par<br>mercuro-réduction de 10 cm <sup>3</sup><br>de solution | 8,75 | 4,0 | 3,4  | 2,8 | 2,0  |
| Pourcentage de phosphore minéralisé                                                                  | 0    | 7,5 | 15,0 |     | 20,0 |

Le diosephosphate réduisant quantitativement le réactif de NESSLER [81], nous voyons que la fonction aldéhydique est décomposée plus rapidement que le phosphore ne se trouve libéré. Sur une fraction de la solution portée à 40° le pouvoir mercuro-réducteur correspondait à 2 cm<sup>3</sup> d'aldéhydes M/20 après 24 heures et 1, 1 cm<sup>3</sup> après 3 jours tandis que les déphosphorylations atteignaient respectivement 17,5 % puis 70 %. A 40°, il y avait une relation plus nette entre la disparition de l'aldéhyde et la libération du phosphore.

A la température ordinaire, l'alcalinité du milieu ne s'est pas sensiblement modifiée, ce qui indiquerait que l'aldéhyde ne s'est pas canizzarisé en donnant naissance à un acide et un alcool. Après deux mois, un léger pouvoir mercuro-réducteur persistait et une partie du phosphore organique était encore minéralisable par le peroxyde d'hydrogène alcalin ; cette dernière propriété est, comme nous allons le voir, caractéristique des esters phosphoriques possédant une fonction aldéhydique ou cétonique libre.

Nous n'avons pas poursuivi ces essais peu encourageants, en effet, supposant que la déphosphorylation en milieu alcalin provenait d'une réaction d'oxydation, nous avons cherché à la renforcer par adjonction de peroxyde d'hydrogène, ce qui nous a donné des résultats d'un plus grand intérêt.

C) ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGÈNE EN MILIEU ALCALIN SUR LE  
DIOSEPHOSPHATE ET D'AUTRES ESTERS PHOSPHORIQUES.

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant couramment utilisé en chimie organique. Son action est en relation avec la réaction du milieu, la température, la présence de catalyseurs ; parmi les catalyseurs positifs on emploie le plus fréquemment les sels de fer et de cuivre.

En milieu neutre ou acide, le peroxyde d'hydrogène peut exercer une action désaminante, hydrolysante, isomérisante [68]. Les alcools acycliques sont généralement déshydrogénés en aldéhydes ; c'est ainsi par exemple, qu'en présence de sulfate ferreux, le glycol est transformé en aldéhyde glycolique [78]. En milieu alcalin, l'oxydation est plus poussée et les aldéhydes formés sont transformés plus ou moins complètement en acide formique. Dans ces conditions, l'aldéhyde glycolique, le glycérol, le mannitol, l'arabinose, le glucose, le fructose, l'amidon, donnent naissance à de l'acide formique [54]. Lorsque les éléments métalloïdiques sont fixés sur la substance organique, ils peuvent être libérés sous forme d'acides oxygénés. Dans une vingtaine de mémoires, KITAMURA [58] a montré que les combinaisons organiques sulfurées donnaient naissance à de l'acide sulfurique.

Les recherches sur les dérivés phosphorés sont peu nombreuses, MANDEL et NEUBERG [68] ont minéralisé par voie humide le phosphore des composés organiques en les traitant à une température légèrement supérieure à la température ordinaire par le peroxyde d'hydrogène en présence d'une faible quantité d'acide nitrique et de nitrate ferrique. Ces auteurs ont pu libérer quantitativement l'acide phosphorique des glycérophosphates, de l'hexosediphosphate, de la phospho-6-glucosazone, du nucléoprotéide pancréatique, de la caséine, du lécithide. Les chimistes ne semblent avoir eu recours qu'exceptionnellement à cette technique, lui préférant en général la destruction sulfonitrique ou la calcination en présence de nitrate de Magnésium. Toutefois, BAUMANN [8] l'a préconisée dans le dosage du phosphore organique sanguin.

A notre connaissance, les seules recherches effectuées avec le peroxyde d'hydrogène alcalin sont celles de MEYERHOF, LOHMANN et SCHUSTER [73] qui ont montré que le méthyltétrosephosphate était oxydé en acides phosphoglycolique et formique. Nous avons observé que le diosephosphate était presque totalement déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin, nous avons été amenés à étudier l'action de ce réactif sur divers esters.

### Action du peroxyde d'hydrogène alcalin sur divers esters.

Nous avons étudié 12 monoesters portant des fonctions différentes sur leur radical carboné. C'est ainsi que nous avons utilisé les méthyl et n-propyl phosphate préparés par la technique de CAVALIER [12-13], le glycol-phosphate obtenu par la méthode de BAILLY [4], les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates obligeamment fournis par Mlle M.C. BAILLY et M. O. BAILLY ; l'acide phosphoglycolique préparé par la méthode de FLEURY et COURTOIS [40] [39], l'acide saccharose-monophosphorique (Hespéronal MERCK), l'acide fructofuranose 1-6 disphosphorique (Hexosediphosphate BAYER), l'acide fructofuranose 6 phosphorique ou ester de NEUBERG [77], l'ester de HATANO [53] : glucose-phosphate obtenu par inversion acide du saccharose-phosphate ; le diose-phosphate isolé des produits d'oxydation periodique de l' $\alpha$  glycérophosphate en utilisant la technique décrite par FLEURY et COURTOIS [40] ; enfin, le phytinate de sodium préparé selon le protocole fixé par POSTERNAK [84]. Les esters ont été utilisés sous forme de solution du sel disodique. Lorsque nous sommes partis des sels de baryum ou de calcium, ces métaux ont été précipités respectivement par les quantités théoriques des acides sulfurique ou oxalique. La solution est ensuite neutralisée par la soude en présence de phtaléine. Nos oxydations ont été effectuées en milieu sodique ou ammoniacal. On mélange 20 cm<sup>3</sup> d'ester M/40 à 10 cm<sup>3</sup> de solution officinale de peroxyde d'hydrogène à 10 volumes (1) et selon les cas à 20 cm<sup>3</sup> de soude 2N ou d'ammoniaque à 20 % en volume. Après 48 heures de contact à la température ordinaire, la solution est neutralisée par l'acide chlorhydrique, additionnée de mixture magnésienne et d'ammoniaque. Le phosphate ammoniacomagnésien précipité après 24 heures est recueilli ; il est soigneusement lavé à l'eau ammoniacale pour éliminer les traces de peroxyde d'hydrogène susceptibles de donner des acides pervanadique ou permolybdique entravant le dosage du phosphore.

Le phosphate dissous dans l'acide nitrique est dosé par la méthode de COPAUX pour les quantités supérieures à 3 mg. et par la technique colorimétrique de MISSON adaptée par FLEURY pour les quantités de 0,1 à 1 mg. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau III.

Nous pouvons constater que d'une façon générale le pourcentage de déphosphorylation est toujours plus élevé en milieu ammoniacal qu'en milieu sodique ; notons que la concentration moléculaire de l'ammoniaque est supérieure à celle de la soude.

(1) Il est indispensable de vérifier l'absence d'acide phosphorique dans le peroxyde d'hydrogène.

TABLEAU III.

Action du peroxyde d'hydrogène alcalin  
sur quelques esters phosphoriques.

| Ester étudié                            | Nature de l'alcali |                 |
|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|
|                                         | Soude              | NH <sub>3</sub> |
| Méthylmonoorthophosphate .....          | 0,3 (1)            | 1,4             |
| n-propylmonoorthophosphate .....        | 3,24               | 1,4             |
| Glycolmonoorthophosphate .....          | 1,3                | 5,0             |
| α-glycérophosphate .....                | 2,4                | 4,0             |
| β-glycérophosphate .....                | 1,75               | 4,4             |
| Acide phosphoglycolique .....           | 0,3                | 1,0             |
| Saccharose monoorthophosphate .....     | 1,1                | 2,3             |
| Fructose 1-6-diphosphate .....          | 44,0               | 52,0            |
| Fructose-6-Phosphate (ester de Neuberg) | 35,0               | 54,0            |
| Glucose-Phosphate de Hatano.....        | 46,0               | 68,0            |
| Diosephosphate .....                    | 96,0               | 97,0            |
| Phytinate de Sodium.....                | 0,7                | < 0,1           |

(1) Les chiffres indiquent le pourcentage de phosphore organique minéralisé.

Les divers esters sont très inégalement sensibles à l'oxydation alcaline, la chaîne carbonée semble constituer le point d'attaque. Le phytinate de sodium dont les six atomes de carbone sont estérifiés n'est pratiquement pas déphosphorylé. Lorsque cette chaîne ne porte aucune autre fonction (méthyl ou n-propyl-phosphate) ou renferme un carboxyle (acide phosphoglycolique), la déphosphorylation est insignifiante. La présence de fonctions alcool augmente faiblement la réactivité (glycolphosphate, α et β-glycérophosphates).

Par contre, l'existence d'une fonction aldéhydique ou cétonique libre favorise considérablement la déphosphorylation : le diosephosphate, dont la fonction aldéhydique est immédiatement au voisinage de la fonction ester, est déphosphorylé presque totalement, les esters de NEUBERG et HATANO sont partiellement déphosphorylés ; la déphosphorylation de l'hexosediphosphate est d'environ 50 % comme si une seule de ses liaisons ester était rompue. Par contre, le saccharose-phosphate dont les fonctions aldéhydiques et cétoniques sont bloquées, ne libère pas plus de phosphore que les esters de polyols. Nous avons étudié d'une façon plus spéciale la réaction de déphosphorylation du diosephosphate.

## Etude détaillée de l'oxydation du diosephosphate.

### A) VITESSE DE DÉPHOSPHORYLATION.

Nous avons étudié l'influence de la durée de contact et de la température sur la libération de l'acide phosphorique.

5 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$ -glycérophosphate M/10 sont oxydés à la température ordinaire par 10 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10 en présence de 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique N. Après deux heures de contact, la solution neutralisée est amenée à 20 cm<sup>3</sup> et additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de peroxyde d'hydrogène officinal et 20 cm<sup>3</sup> de soude 2N. Après un temps de contact variable, la solution est neutralisée et introduite dans un tube de COPAUX. Nous procédons immédiatement au dosage de l'acide phosphorique. Il nous était impossible d'isoler cet acide sous forme de sel ammoniac-magnésien, car la déphosphorylation oxydante aurait continué au cours de cette opération. Toutefois, en présence de mixture magnésienne, la réaction est plus lente et toujours incomplète (déphosphorylation de 50 à 60 %). Le dosage direct a un inconvénient : il tend à se former de l'acide permolybdique à teinte orangée, une partie du molybdène du milieu est bloqué, il ne peut réagir et la précipitation du complexe aquéo-éthéro-phospho-molybdique n'est plus totale. L'emploi d'un excès de molybdate de sodium permet d'obvier à ce fait.

D'autre part, nous avons toujours fait un essai comparatif avec une solution titrée d'acide phosphorique en présence de peroxyde d'hydrogène. Dans le tableau IV où sont inscrits nos résultats, les chiffres indiquent le pourcentage du phosphore organique initial minéralisé.

TABLEAU IV.

Libération de l'acide phosphorique à partir du Diosephosphate.

| Durée de la réaction<br>(en heures) | 0,08   | 0,25 | 0,5 | 1,0  | 3,0  | 8,0  | 24,0 | 48,0 | 96,0 |
|-------------------------------------|--------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Température 22° .....               | 23 (1) | 57   | 63  |      | 70,5 | 78,5 | 88,5 | 97,0 |      |
| Température 44° .....               |        |      |     | 68,0 | 71,5 | 84,0 |      | 94,0 | 97,0 |

(1) Les chiffres indiquent le pourcentage de phosphore organique minéralisé.

A 22° et 44° les vitesses de réaction sont voisines, la vitesse de déphosphorylation est cependant accélérée par une plus forte élévation de température : à 100° en 10 minutes 90 % du phosphore sont libérés. .

La déphosphorylation n'est pas une réaction monomoléculaire comme nous avons pu le vérifier par le calcul en utilisant les données du tableau IV. Le ralentissement qui se manifeste semble correspondre à une décroissance de la concentration en substance oxydante par suite de la destruction progressive du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin.

#### B) IDENTIFICATION DES PRODUITS DE LA RÉACTION.

En milieu sodique, après action du peroxyde d'hydrogène, il n'y a plus de fonctions aldéhydiques libres car à froid le pouvoir mercuro-réducteur du diosephosphate sur le réactif de NESSLER a disparu. Nous avons effectué une série de déterminations sur une préparation obtenue comme suit : une solution chlorhydrique de diosephosphate de baryum est privée de baryum par addition d'acide sulfurique, filtrée, neutralisée à la phtaléine par la soude, additionnée de son volume d'ammoniaque à 20 % et de peroxyde d'hydrogène officinal. Après 48 heures de contact à la température ordinaire, nous avons dosé :

- 1) — l'acide phosphorique libéré.
- 2) — les fonctions acides formées.

La solution est concentrée dans un ballon de Kjeldahl, additionnée de 50 cm<sup>3</sup> de soude N/5 et de nouveau concentrée. Après élimination totale de l'ammoniaque, on ajoute 50 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique N/5 et quelques gouttes d'une solution saturée d'urée pour décomposer l'acide nitreux qui se forme en petites quantités par suite de l'oxydation de l'ammoniaque par le peroxyde d'hydrogène. La solution est portée quelques secondes à l'ébullition pour chasser l'acide carbonique sans entraîner les acides volatils ; l'excès d'acide sulfurique est titré par la soude N/10 en présence de phtaléine ; cette soude correspond exactement à celle qui a neutralisé les acides formés par oxydation. Un témoin où de l'eau distillée est substituée au diosephosphate permet de doser les acides préexistants dans le peroxyde d'hydrogène ou formés par oxydation de l'ammoniaque.

Avec 12,5 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque à 20 % et le même volume de peroxyde d'hydrogène à 10 vol. il se forme 0,1 à 0,3 cm<sup>3</sup> d'acides N/10.

### 3) — les acides volatils.

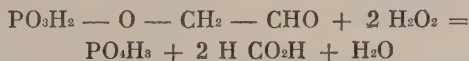
La solution concentrée au bain-marie pour éliminer l'ammoniaque libre est acidifiée par l'acide sulfurique, additionnée de quelques gouttes de solution d'urée et soumise à un entraînement par la vapeur d'eau. Les acides volatils sont titrés dans le distillat par la baryte N/10 en présence de phtaléine.

### 4) — l'acide formique.

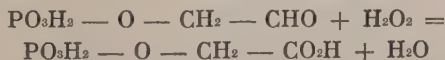
Le distillat neutralisé est concentré et l'acide formique dosé par bromométrie selon la technique d'OBERHAUSER et HENSINGER [80]. Avec un premier échantillon de diosephosphate une dose correspondant à 10 cm<sup>3</sup> de solution M/10 (titrée par mercuro-réduction du réactif de NESSLER) a donné naissance à 9,04 cm<sup>3</sup> d'acide phosphorique M/10, 20,6 cm<sup>3</sup> d'acides volatils N/10 et 17,4 cm<sup>3</sup> d'acide formique M/10. Avec des prises d'essais différentes d'un second échantillon, les résultats sont ramenés à 10 cm<sup>3</sup> de diosephosphate M/10 : il se libère 9,4 cm<sup>3</sup> d'acide phosphorique M/10 et 23,6 — 23,6 et 25,2 cm<sup>3</sup> d'acides totaux N/10 prennent naissance dont 25,2 — 23,2 et 25 cm<sup>3</sup> sont des acides volatils N/10 et 23,3 — 22,8 et 23,6 cm<sup>3</sup> de l'acide formique M/10.

Avec les deux échantillons, le distillat donne très nettement les réactions caractéristiques de l'acide formique : réduction du nitrate d'argent, du chlorure mercurique avec formation de cristaux en forme de croix caractéristiques du chlorure mercurieux.

Le diosephosphate de baryum obtenu par précipitation alcoolique est un corps amorphe, instable dont la pureté n'est jamais absolue ; c'est pourquoi les résultats obtenus avec deux échantillons distincts diffèrent légèrement. Ces résultats montrent que les acides formés sont volatils et constitués presque exclusivement par de l'acide formique : il se forme environ deux molécules de cet acide par molécule de diosephosphate, l'oxydation de ce dernier peut donc être représentée comme suit :



Les acides libérés sont salifiés au fur et à mesure de leur libération. Il paraît difficile de représenter les stades intermédiaires de cette oxydation. En tout cas, la fonction aldéhydique n'est pas oxydée dans une première réaction.



En effet, l'acide phosphoglycolique, qui, d'après cette hypothèse, résulterait de cette réaction, est particulièrement

résistant à la déphosphorylation par le peroxyde d'hydrogène alcalin ; d'autre part, c'est le terme final de l'oxydation par ce réactif du méthyltétrosephosphate et de l'hexose-diphosphate.

Il semble également impossible d'envisager une addition du peroxyde d'hydrogène sur la liaison ester suivie de la rupture de cette dernière ; les résultats obtenus avec divers esters montrent que le radical carboné constitue le point d'attaque par le peroxyde d'hydrogène alcalin (1).

*Conclusion.* — Si on en juge par l'étude de douze esters phosphoriques, le peroxyde d'hydrogène alcalin ne déphosphoryle nettement que les esters possédant une fonction aldéhydrique ou cétonique libre. Le diosephosphate est décomposé et oxydé en une molécule d'acide phosphorique et deux d'acide formique.

#### D) Technique de recherche proprement dite.

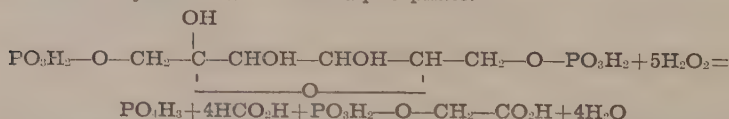
Dans les conditions que nous venons d'exposer les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates ne sont pratiquement pas déphosphorylés. Nous avons tout d'abord recherché si l' $\alpha$ -glycérophosphate pouvait être dosé dans ces conditions en présence de  $\beta$ -glycérophosphate.

1 à 5 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$  ou  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10 sont mélangés à 10 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10 et 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique N. Après un contact de 30 minutes à 20°, l'oxydation periodique est terminée. La solution est neutralisée par de la soude en présence de phtaléine, additionnée de 10 cm<sup>3</sup> de peroxyde d'hydrogène à 10 vol. et selon le cas de 20 cm<sup>3</sup> de soude 2N ou de 10 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque à 20 %.

Après 48 heures de contact à la température ordinaire, la solution est neutralisée et l'acide phosphorique libéré est dosé par la technique de COPAUX après isolement préliminaire sous forme de sel ammoniaco-magnésien (2). Les résultats obtenus

(1) Avec J. COURTOIS [23] nous avons étudié de même l'action du peroxyde d'hydrogène sur l'acide hexosediphosphorique, l'une des fonctions ester est rompue et l'acide phosphorique libéré, la seconde molécule d'acide phosphorique reste liée à l'acide glycolique ; nous avons pu isoler et identifier l'acide phosphoglycolique formé.

Les diverses déterminations analytiques nous permettent de formuler ainsi l'oxydation de l'hexosediphosphate.



(2) L'excès d'acide periodique étant réduit par l'eau oxygénée, la précipitation du periodate de magnésium ne risque pas de s'associer à celle du phosphate ammoniaco-magnésien.

(Tableau V) montrent qu'on peut doser avec une bonne approximation l'acide phosphorique de l' $\alpha$ -glycérophosphate. Avec une dose d' $\alpha$ -glycérophosphate supérieure à 20 mg. de  $P_2O_5$  organique les résultats sont entachés d'une erreur par défaut de 5 % environ.

Le  $\beta$  glycérophosphate n'est que très faiblement déphosphorylé : 3 % environ. Il est ainsi possible de doser l' $\alpha$  en présence de  $\beta$ .

Nous avons complété ces essais en utilisant comme précédemment des milieux synthétiques analogues à ceux pouvant être rencontrés au cours de la recherche de la mutase.

Nous avons suivi une technique dont voici les étapes : inactivation des diastases par chauffage, précipitation du phosphate minéral sous forme de sel de baryum en milieu neutre à la phtaléine, séparation de ce précipité, oxydation periodique en milieu acide de l' $\alpha$ -glycérophosphate, déphosphorylation du diosphosphate formé par le peroxyde d'hydrogène alcalin, dosage de l'acide phosphorique libéré.

**TECHNIQUE UTILISÉE.** — 50 cm<sup>3</sup> de  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10 sont amenés au pH voulu par l'acide acétique N, la solution additionnée de la préparation diastasique, est amenée à 100 cm<sup>3</sup>. Après un certain temps de contact, 10 cm<sup>3</sup> sont prélevés et le phosphore minéral libéré est dosé par notre technique habituelle [14]. Un second prélèvement de 10 cm<sup>3</sup> est placé 10 minutes sur le bain-marie bouillant. Après refroidissement, nous ajoutons 10 cm<sup>3</sup> d'acétate de baryum M/10 et neutralisons à la phtaléine à l'aide de soude 2N. Il se forme un précipité barytique plus ou moins abondant selon le degré d'hydrolyse phosphatasique et la teneur initiale en phosphate de la préparation fermentaire. Nous avons vérifié que la précipitation du phosphate barytique est très rapide et presque intégrale.

Après 5 minutes de contact, nous filtrons et lavons le précipité 3 fois de suite avec 3 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. Les eaux de lavage sont jointes au filtrat, le baryum en excès est précipité par addition de 10 cm<sup>3</sup> de sulfate de sodium M/10.

Sans séparer le sulfate de baryum qui est sans influence sur l'oxydation periodique, nous acidifions par 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique N et ajoutons 10 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10. Après 30 minutes de contact, vers 20° on filtre la solution pour éliminer le baryum qui pourrait catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène; cette catalyse étant lente, nous utilisons 20 cm<sup>3</sup> de peroxyde d'hydrogène à 10 vol. pour laver le précipité. Ce peroxyde d'hydrogène ayant servi au lavage est mélangé soit à 9 cm<sup>3</sup> de lessive de soude à 30 %, soit à 10 cm<sup>3</sup> d'ammoniaque à 20 %. Les solutions mélangées sont versées dans

TABLEAU V.  
Dosage de l' $\alpha$ -glycérophosphate en présence de  $\beta$ .

| mg. de $P_2O_5$<br>organique<br>mis en œuvre | $\alpha$ -glycérophosphate |     |     |      |      |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------|----------------------------|-----|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                              | 0                          | 0   | 0   | 14   | 14   | 14    | 14    | 21    | 28    | 35    |
| mg. de $P_2O_5$<br>minéral<br>libéré         | $\beta$ -glycérophosphate  |     |     |      |      |       |       |       |       |       |
|                                              | 14                         | 28  | 35  | 0    | 14   | 28    | 0     | 14    | 0     | 0     |
| mg. de $P_2O_5$<br>minéral<br>libéré         | Milieu Sodique             |     |     |      |      |       |       |       |       |       |
|                                              | 0,2                        | 0,7 | 1,0 | 13,5 | 13,5 | 14,5  | 20,75 | 19,75 | 26,75 | 32,75 |
| mg. de $P_2O_5$<br>minéral<br>libéré         | Milieu Ammoniacal          |     |     |      |      |       |       |       |       |       |
|                                              | 0,2                        | 0,7 |     | 14   | 13,5 | 14,25 | 20,5  | 20,5  | 26,75 | 33,0  |

le filtrat de l'oxydation periodique. Après 48 heures de contact à la température ordinaire l'acide phosphorique libéré est dosé par la technique indiquée plus haut.

Dans le tableau VI nous avons groupé les résultats obtenus, nous avons opéré sur des mélanges de phosphates,  $\alpha$  et  $\beta$  glycérophosphates analogues à ceux que nous pourrions rencontrer après action d'une mutase.

TABLEAU VI.  
Dosage de l' $\alpha$ -glycérophosphate en présence de  $\beta$   
dans des milieux synthétiques.

| mg. de $P_2O_5$<br>organique mis en<br>œuvre |                                     | mg. de $P_2O_5$<br>minéral<br>ajoutés | cm <sup>3</sup> de glycérol<br>M/10<br>ajoutés | cm <sup>3</sup> d'acide<br>periodique N/10<br>réduits par le<br>précipité barytique (1) | mg. de $P_2O_5$<br>minéral dosé à la<br>fin des diverses<br>manipulations |                           |
|----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| $\alpha$ -glycé-<br>rophos-<br>phate         | $\beta$ -glycé-<br>rophos-<br>phate |                                       |                                                |                                                                                         | milieu<br>sodique                                                         | milieu<br>ammo-<br>niacal |
| 0                                            | 0                                   | 10                                    | 0                                              | 0                                                                                       | < 0,1                                                                     | < 0,1                     |
| 0                                            | 35                                  | 10                                    | 2                                              | 0,2                                                                                     | 1,1                                                                       | 0,5                       |
| 14                                           | 0                                   | 10                                    | 2                                              | 0,25                                                                                    | 10,75                                                                     | 11,25                     |
| 14                                           | 0                                   | 20                                    | 2                                              | 0,4                                                                                     | 11,5                                                                      | 11,0                      |
| 14                                           | 0                                   | 10                                    | 3                                              | 0,3                                                                                     | 11,0                                                                      | 11,0                      |
| 14                                           | 0                                   | 20                                    | 3                                              | 0,6                                                                                     | 10,75                                                                     | 11,0                      |
| 14                                           | 14                                  | 10                                    | 2                                              | 0,2                                                                                     | 11,25                                                                     | 11,5                      |
| 28                                           | 0                                   | 10                                    | 2                                              | 0,3                                                                                     | 22,0                                                                      | 23,0                      |
| 34                                           | 0                                   | 10                                    | 2                                              | 0,4                                                                                     | 31,25                                                                     | 30,0                      |

(1) 1 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$ -glycérophosphate M/10 correspond à 7,1 mg. de  $P_2O_5$  organique et peut réduire 2 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10. 1 cm<sup>3</sup> de glycérol M/10 peut réduire 4 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10.

Quand on élimine par le baryum, le phosphore minéral en présence de phosphore organique ce dernier est fréquemment fixé en proportion plus ou moins importante par le précipité barytique. Nous avons dosé l' $\alpha$ -glycérophosphate dans ce précipité : ce dernier lavé à l'alcool bouillant est dissous dans l'acide sulfurique et l'acide glycérophosphorique titré par oxydation periodique selon la technique de FLEURY et PARIS [45]. Les résultats obtenus font également partie du tableau V.

Nous sommes à même de constater qu'une petite quantité d' $\alpha$ -glycérophosphate est toujours retenue sur le précipité barytique. Cette quantité augmente avec la valeur du rapport  $\frac{\text{phosphore minéral}}{\text{phosphore organique}}$ . Cette perte et l'oxydation non intégrale

du diosephosphate ne permettent de retrouver sous forme minérale que 85 à 90 % du phosphore de l' $\alpha$ -glycérophosphate.

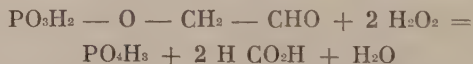
Si la technique n'est pas rigoureusement quantitative, elle permet cependant de doser avec une bonne approximation l' $\alpha$ -glycérophosphate dans ces milieux complexes. L'addition d'une préparation fermentaire immédiatement avant la précipitation barytique n'a pas modifié sensiblement ces résultats. Avec une dose d' $\alpha$ -glycérophosphate correspondant à 35 mg. de  $P_2O_5$  organique en présence de 2 à 4 cgr. de diastase de l'Orge germé du Codex français nous avons retrouvé 27,0 et 29,4 mg. de  $P_2O_5$  minéralisés. Toutefois, nous avons constaté dans certains cas que les substances étrangères introduites par la préparation fermentaire entravent la déphosphorylation oxydante du diosephosphate. Pour un dosage rigoureux, il serait nécessaire de les éliminer par un défécant approprié. Comme nous voulions tout d'abord rechercher la mutase nous avons tourné la difficulté en vérifiant que de l' $\alpha$ -glycérophosphate ajouté au milieu était déphosphorylé ; à une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup> du mélange réactionnel, où nous recherchons l' $\alpha$  glycérophosphate nous ajoutons 4 cm<sup>3</sup> d' $\alpha$ -glycérophosphate M/10, puis nous poursuivons parallèlement les deux séries de dosages. Nous avons obtenu, dans tous les cas, la minéralisation, d'au moins 80 % de l' $\alpha$ -glycérophosphate ajouté.

## CONCLUSIONS DU CHAPITRE I.

Nous avons mis au point une technique analytique permettant le dosage de l' $\alpha$ -glycérophosphate en présence de  $\beta$  dans les milieux complexes.

L'acide periodique oxyde l' $\alpha$ -glycérophosphate en aldéhyde formique et diosephosphate.

Le diosephosphate est un ester infiniment plus fragile que le  $\beta$ -glycérophosphate. Il est déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin ; cette réaction peut être ainsi formulée :



Nous avons pu caractériser et doser l'acide formique qui apparaît.

En étudiant l'action du peroxyde d'hydrogène sur 12 esters phosphoriques, nous avons constaté que seuls les esters possédant une fonction aldéhydique ou cétonique libre sont déphosphorylés d'une façon notable. Le  $\beta$ -glycérophosphate n'est pratiquement pas déphosphorylé.

---

## CHAPITRE II.

# Recherche de la Mutase

La fidélité et l'exactitude de la technique ayant été longuement éprouvée, nous avons recherché la mutase éventuelle dans neuf préparations d'origine végétale et quatre d'origine animale.

### A. — Préparations d'origine végétale.

Dans le domaine végétal nous avons choisi des préparations connues pour leur richesse en autres diastases, ce qui permettait de faire l'hypothèse que si une mutase existait elle se trouvait là plutôt qu'ailleurs. Conjointement à la mutase nous avons également recherché la phosphatase.

Nous dosons l'acide phosphorique libéré selon le protocole habituel, ce qui nous permet d'apprécier l'activité phosphatase. D'autre part nous avons dosé la mutase suivant la technique que nous avons mise au point dans le chapitre précédent. Nous exprimons les résultats en mg. de  $P_2O_5$  libérés. Comme nous allons le voir à l'examen de ces tableaux, nous n'avons jamais pu déceler de mutase dans aucune des préparations étudiées.

#### 1° — LIQUIDE FERMENTAIRE DE STÉRIGMATOCYSTIS NIGRA CRAMER.

Le liquide a été obtenu suivant la technique de HÉRISSEY [55] : culture du *Stérigmatocystis* sur milieu de Raulin, lavage du mycélium et mise en contact de ce dernier avec de l'eau distillée. Une fois en possession de ce liquide fermentaire nous préparons le mélange réactionnel suivant :

|                                                            |                       |
|------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Liquide fermentaire .....                                  | 10 cm <sup>3</sup> .  |
| Solution M/10 de $\beta$ -glycérophosphate de Sodium ..... | 50 cm <sup>3</sup> .  |
| Tampon .....                                               | Variable.             |
| Eau q.s.p. ....                                            | 100 cm <sup>3</sup> . |

nous opérons en double ; une série amenée à pH 5,4 et l'autre à pH 8,8. Nous maintenons sous toluène en flacons stériles à 37° pendant des temps variables. Le tableau n° VII donne les résultats obtenus pour des prises d'essais de 10 cm<sup>3</sup> contenant à l'origine 35 mg. de phosphore organique exprimé en  $P_2O_5$

Ce tableau donne également les résultats obtenus dans les mêmes conditions avec les liquides fermentaires d'*Aspergillus Orizæ* COHN et de *Mucor Javanicus* WEHMER.

TABLEAU VII

Mutase et Phosphatases dans les liquides fermentaires de *Sterigmatocystis nigra*, *Aspergillus orizæ* et *Mucor javanicus*.

| Temps en heures        |             |        | 0      | 1      | 2      | 24     |
|------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Sterigmatocystis nigra | Mutase      | pH 5,4 | 3 (1)  | 1,5    | 3      | 2      |
|                        |             | pH 8,8 | 2      | 1,5    | 2,5    | 3      |
|                        | Phosphatase | pH 5,4 | Traces | Traces | Traces | 4      |
|                        |             | pH 8,8 | Traces | Traces | Traces | Traces |
| Aspergillus orizæ      | Mutase      | pH 5,4 | 2,5    | 2      | 2      | 2      |
|                        |             | pH 8,8 | 3      | 1,5    | 3      | 3      |
|                        | Phosphatase | pH 5,4 | 0      | 0      | 1,5    | 10,5   |
|                        |             | pH 8,8 | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Mucor javanicus        | Mutase      | pH 5,4 | 1,5    | 2      | 1      | 2      |
|                        |             | pH 8,8 | 2,5    | 1      | 2      | 1,5    |
|                        | Phosphatase | pH 5,4 | 0      | 0      | 0      | 3,5    |
|                        |             | pH 8,8 | 0      | 0      | 0      | 0      |

(1) en mg. de  $P_2O_5$  minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

Après ces trois exemples empruntés aux végétaux inférieurs nous nous sommes ensuite adressés aux végétaux supérieurs.

## 2° — POUDRE D'AMANDE DÉLIPIDÉE.

La poudre d'Amande a été délipidée par percolation à l'éther puis dessiccation dans le vide sulfurique. Nous opérons comme précédemment en ce qui concerne la température de réaction et la stérilité des flacons (condition importante sur laquelle nous insistons spécialement maintenant pour ne pas y revenir à chaque fois. Cette précaution que nous avons suivie pendant le cours de nos recherches nous a évité de multiples causes d'erreurs dues aux hydrolyses provoquées par des microorganismes fréquemment présents dans les flacons non stérilisés).

Les résultats obtenus à pH 6 sont donnés dans le tableau VIII avec les chiffres d'autres préparations d'Amande ; les chiffres expriment en milligrammes de  $P_2O_5$  le phosphore minéral libéré dans une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup> d'une suspension de 0,50 g. de poudre pour 100 cm<sup>3</sup> d'une solution de  $\beta$ -glycérophosphate M/20.

### 3° — EMULSINE D'AMANDES DOUCES.

L'émulsine employée dans cette série d'essais a été préparée extemporanément par nous en suivant le principe de la technique de la préparation de l'Emulsine indiquée par HÉRISSEY [55], technique légèrement modifiée par de SAINT-STÉBAN [28].

Nous avons opéré avec 0,10 gr. d'émulsine en suspension dans 100 cm<sup>3</sup> de solution M/20 de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium dans de l'eau bouillie et toluénée à pH 6 ; l'étude comparative de la phosphatase et de la mutase éventuelle en fonction du temps a donné les résultats que l'on trouvera au tableau VIII également.

### 4° — LAIT D'AMANDES.

Nous préparons un lait d'amandes au 1/10. Pour ce faire, nous décortiquons à froid et à sec quelques amandes douces, *Amygdalus Communis* var, *Dulcis* Rosacées, jusqu'à concurrence de 4 gr. et nous les triturons au mortier de façon à obtenir 40 cm<sup>3</sup> de lait avec de l'eau distillée.

Enfin, nous centrifugeons.

Avec le lait ainsi obtenu nous préparons le mélange réactionnel suivant :

|                                                      |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------|
| Lait d'Amandes à 1/10°.....                          | 5 cm <sup>3</sup> .   |
| Solution M/10 de $\beta$ -glycérophosphate de Sodium | 50 cm <sup>3</sup> .  |
| Eau q.s.p. ....                                      | 100 cm <sup>3</sup> . |

Nous ajustons à pH 9,4 avec une solution décijnormale de soude. Nous opérons ensuite suivant le protocole habituel. Les résultats obtenus figurent aussi au tableau VIII.

### 5° — AMANDES DE NOYAUX DE PÊCHES.

Nous préparons une suspension comme pour les amandes et nous utilisons les mêmes proportions de substrat dans deux séries parallèles, une série ajustée à pH 5,9 et l'autre à pH 9,4. D'autre part, nous étudions une série à 37° pendant 30 minutes et une autre à la température ordinaire pendant 48 heures. Le tableau IX résume les résultats obtenus.

TABLEAU VIII.

Mutase et Phosphatase dans quelques préparations d'Amandes.  
T = 37°.

| Temps en heures                           |             | 0       | 0,5 | 1   | 2   | 24  | 48 |
|-------------------------------------------|-------------|---------|-----|-----|-----|-----|----|
| Poudre<br>d'Amande<br>délipidée<br>pH 6,2 | Mutase      | 0,5 (1) |     | 0,5 | 1   | 1   | 1  |
|                                           | Phosphatase | 0,25    |     | 2,5 | 3,5 | 12  | 14 |
| Emulsine<br>pH 6                          | Mutase      | 0,5     |     |     | 0,5 | 1   |    |
|                                           | Phosphatase | 0,5     |     |     | 3   | 9,5 |    |
| Lait<br>d'Amande<br>pH 9,4                | Mutase      |         | 0,5 | 0,5 |     |     |    |
|                                           | Phosphatase |         | 0,3 | 0,2 |     |     |    |

(1) en mg. de  $P_2O_5$  minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

TABLEAU IX.

Mutase et Phosphatase dans les Amandes de noyaux de Pêches.

|             |        | 30' à 37° | 48 h. à t. o. |
|-------------|--------|-----------|---------------|
| Mutase      | ph 5,9 | 0,5 (1)   | 1             |
|             | pH 9,4 | 0,5       | 1             |
| Phosphatase | pH 5,9 | 0,5       | 6,5           |
|             | ph 9,4 | < 0,1     | 0             |

(1) en mg. de  $P_2O_5$  minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

6° — ORGE PERLÉ.

Nous utilisons une poudre fine préparée extemporanément à la dose de 0,10 g. pour 100 cm<sup>3</sup> de solution M/20 de  $\beta$ -glycérophosphate de Sodium. Nous opérons à pH 5,7 et 9 comme dans l'essai précédent : une série à 37° pendant 30 minutes et une autre à la température ordinaire pendant 48 heures.

7° — SEMENCES DE PAVOT BLANC.

Nous opérons avec 0,05 gr. de poudre à pH 5,3 et 9,4. Pour tous les autres détails nous utilisons les mêmes techniques et proportions que pour l'Orge perlé. Le tableau X donne les résultats obtenus pour l'Orge perlé et le Pavot blanc.

TABLEAU X.

Mutase et Phosphatase dans l'Orge et les semences de Pavot blanc.

|                         |             |        | 30' à 37° | 48 h. à t. o. |
|-------------------------|-------------|--------|-----------|---------------|
| Orge perlé              | Mutase      | pH 5,7 | 0,5 (1)   | 1             |
|                         |             | pH 9   | 1         | 1             |
|                         | Phosphatase | pH 5,7 | 0,1       | 0,5           |
|                         |             | pH 9   | 0,1       | 0             |
| Semences de Pavot blanc | Mutase      | pH 5,3 | < 0,1     | 0,5           |
|                         |             | pH 9,4 | < 0,1     | 0,5           |
|                         | Phosphatase | pH 5,3 | < 0,1     | 6,5           |
|                         |             | pH 9,4 | < 0,1     | < 0,1         |

(1) en mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

8° — LIMBE DE FEUILLES FRAICHES D'ÉPINARDS.

Nous sommes partis de 15 grammes de feuilles fraîches d'Épinard lavées soigneusement à l'eau. Après plusieurs lavages nous les avons broyées au mortier avec de l'eau, de manière à avoir au total 150 grammes de préparation aqueuse. Nous obtenons un jus limpide par filtration sous pression réduite. A partir de cette solution qui est d'une belle couleur verte, nous préparons le mélange suivant :

Jus d'épinard ..... 5 cm<sup>3</sup>.  
 Solution M/10 de  $\beta$ -glycérophosphate de Sodium 50 cm<sup>3</sup>.  
 Eau q.s.p. .... 100 cm<sup>3</sup>.

Ce mélange est réparti de manière à obtenir quatre séries d'essais différents suivant le protocole habituel, deux séries à 30' à 37°, une à pH 5,5 et l'autre à pH 9 ; deux séries 48 heures à 18° aux pH ci-dessus.

Le tableau XI résume les chiffres obtenus.

TABLEAU XI.

Mutase et Phosphatase dans les feuilles d'Epinards.

|             |        | 30' à 37° | 48 h. à 18° |
|-------------|--------|-----------|-------------|
| Mutase      | pH 5,5 | 0,5 (1)   | 0,5         |
|             | pH 9   | 0,5       | 0,5         |
| Phosphatase | pH 5,5 | 0         | 6           |
|             | pH 9   | 0         | 0           |

(1) en mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

### B) Préparations d'origine animale.

#### 1° — AUTOLYSAT DE REIN DE PORC.

Obtenu par autolyse dans l'eau chloroformée des reins frais de Porc. Après 8 jours la solution est passée sur un linge fin puis filtrée au coton. Le tableau XII renferme tous les résultats obtenus.

TABLEAU XII.

Mutase et Phosphatase dans l'autolysat du rein de Porc.

| Temps en jours |             | 0  | 1  | 2  | 3  | 4  | 5   |
|----------------|-------------|----|----|----|----|----|-----|
| pH 5,0         | Mutase      | 3  |    | 5  |    | 3  |     |
|                | Phosphatase |    |    | 40 |    | 50 |     |
| pH 6,3         | Mutase      | 13 |    | 6  |    | 1  |     |
|                | Phosphatase |    |    | 43 |    | 53 |     |
| pH 9,8         | Mutase      |    | 13 |    | 11 |    | 1,5 |
|                | Phosphatase |    | 1  |    | 1  |    | 1   |

Les chiffres indiquent le pourcentage de glycérophosphate déphosphorylé.

## 2° — PULPE PLACENTAIRE.

La pulpe de placenta frais de Femme est extraite par le chlorure de potassium isotonique ; cette extraction est effectuée à 0° en utilisant 3 parties de placenta pour 4 de solution chlorurée. Nous préparons ensuite le mélange suivant :

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| Pulpe placentaire .....                              | 3 cm3.   |
| Solution M/10 de $\beta$ -glycérophosphate de Sodium | 50 cm3.  |
| Eau q.s.p. ....                                      | 100 cm3. |

A 37° pendant 24 heures et à pH 6 et 7,8 nous avons obtenu les résultats du tableau XIII.

TABLEAU XIII.

Mutase et Phosphatase placentaire.

|                                                                                     | pH 6      | pH 7,8 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| Mutase                                                                              | < 0,1 (1) | < 0,1  |
| Phosphatase                                                                         | 4,5       | 28     |
| (1) en mg. de $P_2O_5$ minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm <sup>3</sup> . |           |        |

## 3° — HÉMATIES HUMAINES ET SÉRUM HUMAIN.

Nous opérons avec une dilution au 1/10° d'hématies humaines et les proportions de substances en jeu dans la réaction sont les suivantes :

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| Suspension d'hématies à 1/10° .....                  | 10 cm3.  |
| Solution M/10 de $\beta$ -glycérophosphate de Sodium | 50 cm3.  |
| Eau q.s.p. ....                                      | 100 cm3. |

Nous opérons à pH 8 une série 30 minutes à 37° et une autre série 48 heures à 18°.

Dans les mêmes conditions de pH, de temps et de température, nous étudions également le mélange suivant :

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| Sérum humain fraîchement recueilli .....             | 5 cm3.   |
| Solution M/10 de $\beta$ -glycérophosphate de Sodium | 50 cm3.  |
| Eau q.s.p. ....                                      | 100 cm3. |

Le tableau XIV donne les résultats pour les hématies et le sérum.

TABLEAU XIV.

Mutase et Phosphatase dans le Sérum et les hématies.

|          |             | 30' à 37° | 48 h. à 18° |
|----------|-------------|-----------|-------------|
| Sérum    | Mutase      | 0,5 (1)   | 0,5         |
|          | Phosphatase | 0         | 0,1         |
| Hématies | Mutase      | 0,5       | 1           |
|          | Phosphatase | 0         | 0,1         |

(1) en mg. de  $P_2O_5$  minéral libéré sur une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup>.

4° — URINES HUMAINES.

Avec divers échantillons émis à diverses heures, nous avons obtenu à pH 5,2 et à pH 8 dans les conditions habituelles, les résultats résumés dans le tableau XV.

TABLEAU XV.

Mutase et Phosphatase dans l'urine humaine.

| Durée en jours<br>à 37° |        | 1 | 3  |
|-------------------------|--------|---|----|
| Mutase                  | pH 5,2 | 0 | 3  |
|                         | pH 7,5 | 0 |    |
| Phosphatase             | pH 5,2 | 9 | 43 |
|                         | pH 5,7 | 0 |    |

Les chiffres indiquent le pourcentage de glycérophosphate déphosphorylé.

## CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

D'une façon générale comme le montre l'examen des tableaux précédents, on trouve pour une prise d'essai de 10 cm<sup>3</sup> des mélanges réactionnels utilisés une moyenne de 0,5 mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> minéral après les diverses opérations. (Précipitation barytique, oxydation par l'acide periodique puis par le peroxyde d'hydrogène alcalin.)

Les chiffres obtenus dans les recherches de mutase chevauchent avec ceux fournis par les témoins sans diastase ; nous pouvons en déduire qu'il n'y avait pas de mutase dans les échantillons que nous avons étudiés. Il est impossible de généraliser des résultats négatifs et d'affirmer qu'une mutase des glycérophosphates n'existe pas ; nous pouvons seulement constater que si elle existe elle est peu répandue.

Il est particulièrement intéressant de noter que les deux préparations fermentaires où l'on pouvait soupçonner la présence de mutase n'en renferment pas ; ce sont l'autolysat de rein de porc et la poudre d'Amande délipidée. La transposition bio-chimique du  $\beta$ -glycérophosphate en  $\alpha$  observée par J. COURTOIS [20, 21] en présence de ces deux préparations fermentaires provient donc d'une synthèse de l' $\alpha$ -glycérophosphate à partir des produits d'hydrolyse du  $\beta$ . Enfin, l'étude de ces diverses préparations contenant des phosphatases indique qu'une mutase ne paraît pas intervenir dans les hydrolyses phosphatasiques habituelles.

On peut donc admettre que les multiples recherches effectuées sur les cinétiques d'hydrolyse des  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates étudiées isolément ou simultanément ne sont pas perturbées par une mutase.

---



## DEUXIÈME PARTIE

---

# Etude de la Phosphatase urinaire

---

### CHAPITRE PREMIER.

---

#### Historique.

L'urine normale renferme une phosphatase qui a été l'objet d'un certain nombre de recherches. Les résultats apparaissent à première vue souvent contradictoires, mais un examen plus détaillé montre que ceci peut être attribué au fait que les auteurs ont effectué leurs essais à des pH différents.

La phosphatase urinaire semble pouvoir être rangée dans le type A<sub>2</sub>, mais il est possible que normalement ou pathologiquement l'urine renferme de la phosphatase A<sub>1</sub>.

FOLLEY et KAY [48] ont proposé de classer les phosphatases en quatre principaux types se différenciant par leur pH optimum d'activité, leur action sur les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates, l'action accélératrice ou inhibitrice de divers sels.

#### La Phosphatase A<sub>1</sub>.

Cette diastase a été retrouvée dans la plupart des organes des mammifères, son pH optimum est en milieu alcalin : vers 8,0 — 9,0, elle hydrolyse en général le  $\beta$ -glycérophosphate plus rapidement que l' $\alpha$ , très fortement activée par les sels de magnésium, elle n'est pas inhibée par les fluorures.

Une diastase de ce type a été signalée irrégulièrement dans l'urine,

F. DEMUTH [27], qui fut le premier à décèler une activité phosphatasique dans l'urine, n'observa pas d'action en milieu alcalin sur l'hexosediphosphate. UMENO [87] fit réagir 40 cm<sup>3</sup> d'urine sur 0 g. 40 de glycérophosphate disodique, on peut donc considérer qu'il se trouvait en milieu neutre ou faiblement alcalin, il observa une faible activité phosphatasique dans les urines de sujets normaux ou néphritiques.

W. KUTSCHER [60] signala en 1935 que l'urine normale renfermait une petite quantité de phosphatase A<sub>1</sub> analogue à celle du sang. La diastase urinaire hydrolyse à pH 9,2 le  $\beta$ -glycérophosphate plus rapidement que l' $\alpha$ . Dans son mémoire, KUTSCHER se propose d'entreprendre l'étude de cette phosphatase, mais à notre connaissance, il n'a rien publié depuis sur cette question.

C.A. FLOOD, E.B. GUTMAN et A.B. GUTMAN [47] ont signalé que l'urine du Chat à la différence de celle de l'Homme et du Chien renferme des quantités notables de phosphatase A<sub>1</sub> active à pH 9,0. Ils en déduisent que le rein du Chat peut excréter la phosphatase sérique.

R. IWATSURU et K. NANJO [56] semblent avoir effectué leurs essais vers pH 8,0, ils utilisent comme substrat le  $\beta$ -glycérophosphate disodique ou le monophénylphosphate dipotassique et tamponnent avec du véronal sodique.

Ces auteurs signalent une activité phosphatasique infime dans l'urine de l'Homme normal. Par contre, la leucémie s'accompagne d'une forte activité phosphatasique urinaire. L'irradiation par les rayons X augmente nettement l'activité phosphatasique.

IWATSURU et NANJO supposent que cette phosphatase A<sub>1</sub> urinaire provient des leucocytes détruits, les leucocytes renferment comme l'a montré ROCHE J. [85] une phosphatase A<sub>1</sub>, cette dernière pourrait passer dans le sang et être éliminée par le rein.

Par contre, DMOCHOWSKI A. [29] n'a trouvé aucune activité phosphatasique de l'urine à pH 9,0.

Il semble donc que l'urine puisse renfermer une phosphatase A<sub>1</sub> peu active.

### La Phosphatase A<sub>2</sub>.

Cette diastase très répandue chez les Phanérogames se rencontre en petite quantité dans les tissus animaux : foie, rein, sérum ; le muscle et surtout la prostate en renferment d'une façon notable. La phosphatase A<sub>2</sub> à un pH optimum vers 5,0 — 5,6, elle hydrolyse en général le  $\beta$ -glycérophosphate plus rapidement que l' $\alpha$ , elle n'est pas activée par les sels de magnésium qui exercent même une faible inhibition, par contre les fluorures l'inhibent très fortement,

La présence d'une phosphatase du type  $A_2$  dans l'urine normale semble maintenant établie d'une façon indiscutable.

En 1935, DEMUTH [27] signale que l'urine hydrolyse l'hexosediphosphate, le pH optimum est aux alentours de 5,0 avec les urines de nourrissons, enfants, adultes et d'enfants rachitiques.

Utilisant comme substrat le  $\beta$ -glycérophosphate, DMOCHOWSKI A. [29] en 1933 retrouve une phosphatase de pH optimum 5,5, faiblement active à pH 7,0. Il signale pour la première fois un fait qui devait être maintes fois confirmé par la suite : les nettes variations de l'activité chez le même sujet, chez des malades et des personnes normales.

Cette phosphatase paraît assez stable, elle ne perd pas son activité en conservant plusieurs mois sous toluène l'urine non dialysée.

DMOCHOWSKI A. et ASSENHAYM D. complétèrent ces recherches [30], la dialyse qui élimine les phosphates accroît l'activité de la phosphatase. Cette dernière peut être précipitée dans l'urine dialysée par l'alcool et l'acétone en fournissant une poudre très active. La phosphatase urinaire n'est pas activée par les sels de magnésium et est inhibée par les fluorures, DMOCHOWSKI considère que la phosphatase urinaire est d'origine rénale.

A la même époque, WALDSCHMIDT-LEITZ et NONNENBRUCH [88] décèlent également dans l'urine une phosphatase active vers pH 5,0-6,0, mais ils lui attribuent comme origine les hématies.

Cette interprétation paraît fort discutable, ROCHE et ses élèves ont signalé dans les hématies la présence de phosphatases  $A_1$ ,  $A_3$  et  $A_4$ .

Cette dernière est la plus importante ; chez les animaux elle semble même spécifique des hématies. Ses propriétés sont différentes de celles de la phosphatase urinaire : pH optimum vers 6,0 — 6,5 — hydrolyse beaucoup plus rapide de l' $\alpha$ -glycérophosphate que du  $\beta$ , faible activation par l'ion (Mg) et minime inhibition par les fluorures.

En 1935 également, KUTSCHER [60] confirme la présence d'une phosphatase  $A_2$  dans l'urine : pH optimum peu saillant entre 4,0 et 5,1, la diastase hydrolyse le phénylphosphate plus rapidement que le  $\beta$ -glycérophosphate, lui-même dédoublé plus vite que son isomère  $\alpha$ , l'ion (Mg) n'active pas la phosphatase urinaire. KUTSCHER obtint également une préparation fort active en dialysant l'urine, la concentrant sous vide et précipitant par l'alcool-éther. Par la suite KUTSCHER et WÖRNER [63] ont purifié la phosphatase urinaire en soumettant l'urine à l'électrodialyse. WOLBERGS H. [89] étudia dans le laboratoire de KUTSCHER l'élimination phosphatasique urinaire. Il confirma à nouveau son irrégularité, cependant, d'une façon générale,

l'urine d'Homme se montre de 3 à 5 fois plus active que celle de Femme. La différence est surtout nette dans l'urine émise après le réveil et WOLBERGS attribue ce fait à la présence de phosphatase prostatique. La prostate renferme une phosphatase  $A_2$  dont les propriétés sont analogues à celles de la phosphatase urinaire. KUTSCHER et WÖRNER [63], KUTSCHER et PANY J. [61].

WOLBERGS n'a pas remarqué de relations entre l'élimination phosphatasique, le pH de l'urine ou sa teneur en phosphates. L'administration de glucose abaisse en général l'activité phosphatasique, l'injection d'insuline l'augmente.

Enfin, KUTSCHER et WOLBERGS [62] ont observé que l'alimentation végétale accroît l'activité phosphatasique urinaire. L'absorption de légumes, de fruits ou même d'acide ascorbique entraîne l'élimination d'urine riche en phosphatase, le jeûne au contraire en diminue l'activité.

Par ailleurs, BAMANN et SALZER [7] ont confirmé la présence d'une phosphatase  $A_2$  dans l'urine. Le pH optimum est situé à 5,5 aussi bien pour l'urine d'Homme que pour celle de Femme ou de Porc, la dialyse ne modifie pas le pH optimum, BAMANN considère la phosphatase urinaire comme pratiquement homogène.

On considère actuellement que les pyrophosphates sont hydrolysés par des pyrophosphatases spécifiques distinctes des monoestérases qui dédoublent les monoesters orthophosphoriques. La présence de pyrophosphatase dans l'urine reste encore à démontrer.

AXMACHER F. [2] n'a pas observé d'hydrolyse des pyrophosphates par l'urine à pH 7,23. Par contre, DMOCHOWSKI [29] trouve une pyrophosphatase nettement active à pH 5,5, peu active à pH 7,0. Enfin, BAMANN F. et GALL H. [6] considèrent qu'à pH 5,5 la phosphomonoestérase urinaire est pratiquement privée de pyrophosphatase.

A pH 5,5 la phosphatase urinaire n'est pas inhibée par le phloridzozide et les hétérosides voisins. COURTOIS et RABATÉ [26], la phosphatase  $A_2$  de l'émulsine est également insensible à ces corps qui inhibent plus ou moins énergiquement des phosphatases d'autres types.

L'examen de ce résumé des principaux travaux touchant la phosphatase urinaire montre que toute la lumière est loin d'être faite sur la question et que les auteurs ne sont pas d'accord ni sur son origine, ni sur son pH optimum en particulier sur le fait de savoir s'il existe une phosphatase alcaline et une acide. C'est pourquoi nous avons entrepris d'éclaircir ces différents points.

Les phosphatases des différents types peuvent coexister dans le même organe, nous avons indiqué plus haut que ROCHE avait différencié des phosphatases des types  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_3$  dans les

hématics. BAMANN et ses collaborateurs ont mis en évidence des enzymes du type  $A_1$ ,  $A_2$  et  $A_3$  dans le foie et le rein. Le Sérum sanguin renferme des phosphatases  $A_1$  et  $A_2$ .

On dénomme phosphatases isodynames ces phosphatases de types différents qui peuvent coexister dans le même organe. Nous nous sommes proposés de rechercher si l'activité phosphatasique urinaire pouvait être rapportée à un seul type de phosphatase ou au mélange d'enzymes de types distincts.

Nous avons ainsi été amenés à effectuer les déterminations qui permettent en général de différencier les divers groupes de phosphatases.

- 1) détermination du pH optimum.
- 2) action sur les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates.
- 3) action des sels de magnésium qui activent la phosphatase  $A_1$  et inhibent faiblement la phosphatase  $A_2$ .
- 4) action du fluorure de sodium qui a peu d'action sur la phosphatase  $A_1$  et inhibe fortement la phosphatase  $A_2$ .

Nous nous sommes en outre préoccupés des variations de l'élimination phosphatasique au cours de la journée et des différence entre l'élimination chez l'Homme et chez la Femme et enfin nous envisagerons l'origine possible de la phosphatase urinaire.

Après nous être assurés dans la première partie de ce travail qu'aucune mutase n'intervenait pour perturber les hydrolyses phosphatasiques, nous étions tranquilles de ce côté pour entreprendre les recherches destinées à apporter une réponse aux points d'interrogation posés par les points ci-dessus. Avant de commencer l'étude proprement dite de la phosphatase urinaire, il nous a fallu mettre au point une technique de travail pratique et précise et c'est ce qui va faire l'objet des deux chapitres suivants.

---

## CHAPITRE II.

---

### ACTION DE L'ACIDE PERIODIQUE SUR L'URINE.

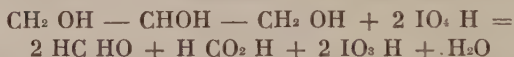
---

Dans l'étude des hydrolyses phosphatasiques, on utilise en général comme substrats les  $\alpha$  ou  $\beta$ -glycérophosphates de sodium ; l'activité est évaluée en titrant le phosphore minéral libéré par une des techniques classiques de micro-dosage du phosphore.

Comme dans le milieu que nous étudions il existe déjà du phosphore minéral, nous avons pensé simplifier les dosages et éviter de soustraire un chiffre élevé en dosant le glycérol libéré.

Parmi les méthodes de dosage du glycérol qui s'offraient à nous, la méthode de M. FATOME [35] avait tout de suite retenu notre attention par son exactitude et sa simplicité.

Le principe de cette réaction est le suivant : une molécule de glycérol est oxydée par deux molécules d'acide periodique en deux molécules de formaldéhyde et une d'acide formique.



Dans les milieux qui contiennent des substances glucidiques oxydables par l'acide periodique, FLEURY et FATOME [43] ont décrit une technique qui permet de conserver le glycérol en solution ; ils détruisent et fixent les substances glucidiques réductrices par la baryte en milieu alcoolique concentré.

Nous avons pu constater que l'urine normale réduisait l'acide periodique ; malgré les différents essais que nous avons faits nous n'avons pu éliminer complètement les substances oxydables par l'acide periodique et existant normalement dans l'urine. Malgré l'insuccès de ces recherches nous les exposerons néanmoins et nous essaierons d'en tirer quelques conclusions en rapport avec la question du « Carbone indosé urinaire ».

De nombreux travaux, ceux de LAMBLING en particulier, ont attiré l'attention sur le carbone indosé urinaire ; cette question est intimement liée à celle des glucides de l'urine normale.

R. BERNIER en 1910 [9], P. AMBERT en 1929 [1] ont étudié ces substances glucidiques et résumé l'état actuel de la question à cette époque.

L. GRIMBERT et R. BERNIER [52] ont montré que l'osazone obtenue à partir de l'urine normale est constituée en majeure partie par l'osazone de l'acide glycuronique, l'autre partie

moins abondante et moins constante est de la glucosazone. Divers auteurs ont pu obtenir de la glucosazone à partir de l'urine normale.

Les résultats de nombreux auteurs diffèrent sur les points de fusion des osazones obtenues à partir de l'urine normale ; ces divergences peuvent être en parties interprétées à l'aide d'un fait signalé par M.R. EVERETT et F. SHEPPARD [34], au cours du chauffage avec la phénylhydrazine l'urée réagit et il se forme de la 1-phénylsemicarbazide séparée et identifiée à partir du précipité d'osazones.

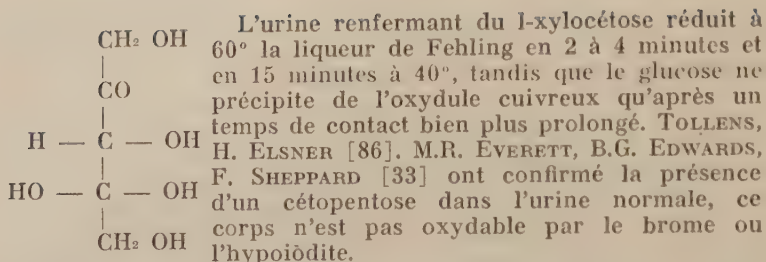
P. FLEURY et P. AMBERT [37] ont appliqué à l'urine la méthode d'entraînement des glucides de SALKOWSKY, ces derniers sont fixés par un précipité d'hydroxyde cuivrique en milieu alcalin. Le carbone glucidique ne renfermerait que moitié de substances cupro-réductrices.

Dans ces substances glucidiques non réductrices il faut probablement faire rentrer les dextrines signalées dans l'urine par divers auteurs.

D'autre part, nos essais nous ont montré que l'urine normale renfermerait des substances qui se comportent comme des polyols. Nous n'avons trouvé que peu d'indications sur la présence des polyols dans l'urine. GALLOIS en 1864 a signalé la présence d'inositol dans l'urine. G. MEILLÈRE et P. FLEURY [68] ont retrouvé de 0 g.25 à 2 g. d'inositol dans les urines glycosuriques. L'inositol a été caractérisé dans l'urine des diabétiques, d'un animal où la glycosurie est provoquée par piqûre du plancher du 4<sup>e</sup> ventricule, dans le diabète phloridzique. G. MEILLÈRE et P. FLEURY ont en outre trouvé de l'inositol dans les urines où se manifeste une glycosurie transitoire à la suite de maladies infectieuses ou d'intoxications passagères.

Il est également possible que l'urine normale renferme du glycérol ; M. NICLOUX appliquant à l'urine normale du Chien la technique qui lui a permis d'identifier et doser le glycérol dans le sang signale [79] que « L'urine renferme une très petite quantité d'une substance susceptible d'être entraînée par la vapeur d'eau dans le vide et qui réduit le bichromate. »

Depuis le travail d'AMBERT, la question des sucres normaux urinaires est demeurée aussi confuse, toutefois l'école Américaine semble avoir identifié avec certitude un pentose cétonique dans l'urine normale. Ce pentose dénommé uropentose a été isolé par I. GREENWALD [50, 51] ; il a séparé la p-bromophénylhydrazone (P.F. 130° - 131°) d'où il a régénéré le sucre identifié au 1 (+) xylocétose, ce sucre appartient à la série (I) et est dextrogyre, sa phénylosazone est également dextrogyre, elle est identique à la 1-xylosazone (P.F. 161° - 163°) ; le xylocétose est plus fortement réducteur que le glucose,



P. BALINT [5] a pu isoler et identifier le xylocétose des urines de 4 sujets atteints de pentosurie chronique. M. ENKLEWITZ et M. M. LASKER [32] ont identifié le xylocétose dans 38 cas de pentosurie. Ce sucre dériverait de l'acide glycuronique car il existe un net parallélisme entre l'élimination de l'acide glycuronique et celle du cétopentose. Divers médicaments éliminés sous forme de conjugués glycuroniques : antipyrine, bornéol, menthol, augmentent l'excrétion de pentose. D'autre part l'administration d'acide glycuronique a le même résultat.

En ce qui nous concerne ce n'est pas à ce point de vue que nous avons apporté notre contribution à cette question. En effet, notre but en faisant agir sur l'urine l'acide periodique était de titrer le glycérol libéré après hydrolyse phosphatassique. C'est en faisant des essais témoins que nous nous sommes aperçus que l'urine fraîchement émise réduisait une quantité notable d'acide periodique.

A la suite de cette observation nous avons alors fait une étude plus systématique de l'oxydation periodique de l'urine aux différentes heures de la journée ; nous avons fait varier la durée de contact de l'urine avec l'oxydant.

Ces premiers résultats acquis, nous avons essayé d'éliminer les substances oxydables par l'acide periodique en nous adressant à différents procédés de défécation ou à la technique d'élimination des sucres par la baryte alcoolique par la méthode de M. FATOME [35].

Qu'il s'agisse d'urine pure ou traitée, le protocole des expériences est le suivant : nous opérons sur des quantités déterminées d'urine en pratiquant toujours deux dosages sur des quantités variant du simple au double à titre de vérification. Au début nous avons opéré sur 5 cm<sup>3</sup> et 10 cm<sup>3</sup> puis, nous étant trouvé plusieurs fois en présence d'urines plus riches en substances oxydables par l'acide periodique, nous avons mis en œuvre 2 cm<sup>3</sup> et 4 cm<sup>3</sup> d'urine ou des prises d'essais correspondant à ces volumes.

Au volume d'urine prélevé nous ajoutons 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique puis 10 cm<sup>3</sup> d'acide periodique N/10 (M/20), on

laisse un certain temps en contact, finalement nous titrons l'excès d'acide periodique non réduit par la technique à l'anhydride arsénieux de P. FLEURY et J. LANGE [44].

Nous exprimerons les résultats en cm<sup>3</sup> de solution décimor-  
male d'oxydant réduit. La solution normale d'oxydant corres-  
pond à un demi atome gramme d'oxygène (8 gr.) par litre.

# I. — URINE PURE.

Nous avons choisi des urines émises à différentes heures de la journée, mais à des heures caractéristiques où la composition de l'urine a le plus de chance de varier, c'est-à-dire au réveil, immédiatement avant le déjeuner après la période de jeûne de la matinée, puis aussitôt après déjeuner et enfin vers 16 heures.

Nous nous sommes bornés à ces quatre échantillons, car l'augmentation du nombre de ces derniers dans la suite des 24 heures ne faisait que nous ramener à d'autres cycles à peu près identiques.

Pour ces quatre catégories d'urines nous avons fait des oxydations periodiques en faisant varier le temps de contact, nous avons choisi 10 minutes, 1 heure, 18 ou 24 heures, car l'oxydation est fonction de la durée de contact.

Le tableau N° XVI donne les résultats obtenus.

TABLEAU XVI.

Oxydation periodique de l'urine aux diverses heures  
de la journée et en fonction de la durée de contact  
avec l'acide periodique.

| Durée de contact<br>en heures                             | 0,16     | 1    | 18   | 24   |
|-----------------------------------------------------------|----------|------|------|------|
| Urines de 7 heures...                                     | 1263 (1) | 1625 |      | 1875 |
| Urines de 12 heures..                                     | 465      | 555  | 740  |      |
| Urines de 14 heures..                                     | 875      | 1045 | 1400 |      |
| Urines de 16 heures..                                     | 655      | 655  | 820  |      |
| (1) en cm <sup>3</sup> de solution N/10 d'oxydant réduit. |          |      |      |      |

Ces chiffres montrent que l'urine du matin et celle après déjeuner sont plus riches en substances oxydables par l'acide periodique que les deux autres. Ceci est logique, car l'urine du matin et celle après déjeuner sont plus chargées en substances

en solution que les deux autres. De plus, ces substances sont assez rapidement oxydables, puisqu'en 10 minutes on a un chiffre supérieur à la moitié du chiffre obtenu en 18 ou 24 heures.

Toutefois, nous ferons remarquer que ces substances sont plus lentement oxydées par l'acide periodique que les aldohexoses et les polyols acycliques P. FLEURY et J. LANGE [44].

## II. — ACTION DE DIVERS DÉFÉCANTS.

### a) acétate neutre de Plomb.

Nous avons cherché si l'acétate neutre de plomb qui entraîne un certain nombre de constituants urinaires et laisse en solution les sucres, précipitait les substances oxydables par l'acide periodique.

Les quatre urines employées dans l'essai précédent sont déféquées avec l'acétate neutre de plomb à 30 p. 100 (Réactif de Courtonne) suivant le protocole habituel et avec élimination de l'excès de plomb par le sulfate de sodium.

Dans les mêmes conditions que ci-dessus nous avons obtenu les résultats donnés par le tableau N° XVII.

TABLEAU XVII.

Oxydation periodique de l'urine déféquée à l'acétate neutre de Plomb.

| Durée de contact<br>en heures | 0,16     | 1    | 24     |
|-------------------------------|----------|------|--------|
| Urines de 7 heures...         | 1100 (1) | 1100 | 1512,5 |
| Urines de 12 heures..         | 495      | 495  | 770    |
| Urines de 14 heures..         | 825      | 990  | 1320   |
| Urines de 16 heures..         | 550      |      | 880    |

(1) en cm<sup>3</sup> de solution N/10 d'oxydant réduit.

La comparaison des deux séries de chiffres ne nous révèle pas de grosses différences, à part le cas de l'urine de 7 heures. La défécation plombique entraîne surtout les éléments du groupe urique, il est évident que ce ne sont pas eux à qui l'on peut rapporter la réduction de l'acide periodique.

D'ailleurs, pour vérifier cette assertion, nous avons appliqué à une solution d'urée et à une solution d'acide urique, toutes deux à des concentrations analogues à celles rencontrées dans l'urine, notre protocole d'oxydation periodique. Dans les deux cas, nous n'observons aucune réduction nettement mesurable.

*b) Eau de Baryte.*

L'urine de 7 heures du matin est neutralisée à la phtaléine par de l'eau de baryte, le précipité formé est éliminé par filtration, ce précipité décomposé par l'acide sulfurique correspond à une réduction de 76 cm<sup>3</sup> par litre ; le filtrat réduit 1275 cm<sup>3</sup> en 10 minutes et 1837 cm<sup>3</sup> en 60 heures ; les substances réductrices ne sont donc pas des acides organiques à sels de Baryum insolubles.

*c) Sels de Mercûre.*

Nous avons préparé une solution acide de sulfate mercurique selon la technique d'AMBERT [1].

|                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Oxyde jaune de Mercure..... | 40 g.                 |
| Eau distillée .....         | 150 cm <sup>3</sup> . |

On ajoute petit à petit en agitant :

|                                          |                      |
|------------------------------------------|----------------------|
| Acide sulfurique pur ( $D = 1,84$ )..... | 35 cm <sup>3</sup> . |
|------------------------------------------|----------------------|

On agite jusqu'à dissolution. On laisse refroidir. On complète à 200 cm<sup>3</sup> et on filtre.

Cette défécation plus complète que les précédentes élimine la presque totalité des constituants normaux de l'urine : outre l'acide urique, les bases xanthiques et les pigments déjà éliminables par l'acétate neutre de plomb, les sels de mercure précipitent la créatinine et la créatine, l'allantoïne, l'indoxyle, et les dérivés indoliques et scatoliques, la leucine, la tyrosine, l'acide diacétique, les albumoses et les peptones.

A 50 cm<sup>3</sup> d'urine nous ajoutons 25 cm<sup>3</sup> de réactif mercurique. Nous neutralisons par de la lessive de soude jusqu'à virage de la phtaléine, ensuite nous acidifions faiblement par l'acide acétique et complétons à 100 cm<sup>3</sup>. Après filtration sur un filtre à plis, l'excès de mercure est précipité par un courant d'hydrogène sulfuré dont on élimine l'excès par un courant d'air. Nous ramenons alors à un volume déterminé : 200 cm<sup>3</sup> et prélevons les parties aliquotes correspondant à 2 et 4 cm<sup>3</sup> d'urine. C'est sur cette solution ainsi préparée que nous procédons à l'oxydation periodique. Sur une urine de 7 heures du matin la réduction est de 700 après 10 minutes, 750 après 1 heure et 1.000 après 24 heures.

L'action des trois défécants permet de considérer que la

majeure partie des substances réductrices se comportent comme des glucides, nous avons cherché si des défécants qui éliminent les glucides fixeraient les substances oxydables. P. AMBERT [1] appliquant à l'urine la réaction de SALKOWSKI, a montré qu'en milieu alcalin sodique ou barytique, l'hydroxyde de cuivre fixait la presque totalité des substances glucidiques urinaires.

*d) Cuivre et baryte.*

20 cm<sup>3</sup> d'urine émise à 7 heures du matin sont additionnées de 5 cm<sup>3</sup> de solution de sulfate de cuivre à 20 %. On ajoute alors à la burette 50 cm<sup>3</sup> de solution environ N/2 de baryte en agitant continuellement et en maintenant le flacon à la température de la glace fondante. On complète à 100 cm<sup>3</sup> avec de l'eau distillée et on filtre aussitôt : le filtrat est à peine bleu et il n'y a donc pas de « peptisation » appréciable du précipité cuivrique.

Nous prendrons 50 cm<sup>3</sup> du filtrat dans lesquels nous éliminons le baryum par l'acide sulfurique en présence de phtaléine. Au bout de 24 heures le filtrat réduisait 375 cm<sup>3</sup> d'acide periodique pour 1 litre. La défécation à l'hydrate de cuivre en milieu alcalin a donc fixé des substances réduisant l'acide periodique, mais il reste encore des substances réductrices en solution.

*c) Cadmium et baryte.*

J. COURTOIS [16] a montré que dans la réaction de SALKOWSKI on pouvait substituer d'autres métaux au cuivre : le cadmium et le fer entre autre. En suivant un protocole opératoire analogue au précédent, nous avons déféqué par le sulfate de cadmium et la baryte; le filtrat correspondait à 800 cm<sup>3</sup> de substances réductrices pour 1.000 cm<sup>3</sup> d'urine. L'hydroxyde de cadmium entraîne beaucoup mieux les sucres que les polyols. J. COURTOIS [16]. L'hydroxyde de cuivre entraîne très bien les deux groupes de constituants. Il est possible que l'urine renferme des polyols car le cuivre entraîne beaucoup plus de substances réductrices que le cadmium.

*f) Alcool éthylique.*

Enfin nous avons cherché si les substances oxydables par l'acide periodique étaient solubles dans l'alcool. Nous avons pu constater que l'urine de 7 heures évaporée à sec au bain-marie et reprise par l'alcool cède à ce solvant des substances réductrices : 300 cm<sup>3</sup> d'oxydant sont réduits en 10 minutes, 450 en 1 heure, 500 en 60 heures.

*g) Elimination par le baryte alcoolique.*

M. FATOME a montré qu'en traitant une solution contenant du glycérol et des sucres par la baryte dans un milieu à titre élevé en alcool le glycérol reste en solution, tandis que les sucres sont insolubilisés.

P. FLEURY et M. FATOME [43] ont pu appliquer cette technique pour doser à l'aide de l'acide periodique le glycérol dans les vins, diverses préparations galéniques : élixir de pepsine, extrait fluide glyciné de quinquina et les préparations opothérapiques.

Nous avons utilisé la technique de FATOME en additionnant 5 cm<sup>3</sup> d'urine de 1 g. de baryte hydratée ; après 2 heures de contact à la glacière, on complète à 50 cm<sup>3</sup> avec de l'alcool à 95° et laisse en contact 24 heures à la glacière, après centrifugation le liquide surnageant est séparé, 25 cm<sup>3</sup> sont additionnés de quelques gouttes d'acide sulfurique dilué pour éliminer l'excès de baryum, après addition de 25 cm<sup>3</sup> d'eau le mélange est placé à l'étuve à 100° jusqu'à réduction à 25 cm<sup>3</sup>, ce qui amène l'élimination presque totale de l'alcool. Il reste ainsi une substance oxydable par l'acide periodique et les résultats obtenus en fonction du temps sont indiqués dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII.

Oxydation periodique de l'urine après élimination  
par la baryte alcoolique.

| Durée de contact<br>avec l'acide periodique<br>en heures | 0,08 | 0,25 | 1   | 24  | 48  |
|----------------------------------------------------------|------|------|-----|-----|-----|
| cm <sup>3</sup> d'oxydant N/10<br>réduit                 | 150  | 200  | 400 | 500 | 500 |

La substance est beaucoup plus lentement oxydée par l'acide periodique que les polyols linéaires, l'oxydation rappellerait plutôt celle des polyols cycliques comme l'inositol. La méthode de FATOME ayant été éprouvée avec des produits d'origine biologique les plus divers, on peut supposer que l'urine renferme des polyols peut-être cycliques.

A notre connaissance leur présence dans l'urine n'a jamais été signalée d'une façon systématique.

Dans un certain nombre d'autres essais, nous avons toujours retrouvé dans l'urine une quantité importante de substances se comportant comme le glycérol dans la technique de FATOME.

Nous avons tenté de caractériser le glycérol dans les solutions obtenues. Nous avons eu recours à la réaction de DENIGÈS, après traitement par la baryte alcoolique : en utilisant la transformation en méthylglyoxal par oxydation bromée et condensation du méthylglyoxal aux phénols, nous n'avons pu mettre en évidence le glycérol dans les divers échantillons d'urine analysés.

## CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

Dans des essais préliminaires nous avons constaté que l'urine renfermait des substances oxydables par l'acide periodique, notre but n'était pas de les identifier, mais de chercher à les éliminer par une méthode simple et pratique pour ne doser à l'acide periodique que le glycérol libéré. Nous n'avons jamais pu éliminer ces constituants urinaires.

Les résultats de nos essais laissent supposer dans l'urine normale la présence de polyols. D'autre part ils montrent que l'on pourrait utiliser l'acide periodique pour étudier le carbone glucidique urinaire normal.

---

## CHAPITRE III.

---

### TECHNIQUE DE MESURE de l'activité phosphatasique urinaire.

---

Avant d'écarter définitivement la méthode d'élimination barytique de FATOME, nous avons voulu savoir si nous gagnerions en précision en l'employant dans la détermination de l'activité phosphatasique de l'urine bien que l'élimination des substances oxydables par l'acide periodique et contenues dans l'urine soit très incomplète.

Pour faire cette étude, nous avons constitué des mélanges analogues à ceux que nous allons rencontrer dans l'étude de l'activité phosphatasique urinaire. En effet, pour déterminer cette activité, nous mélangerons une certaine quantité d'urine à un volume donné de solution de  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/5 ; l'hydrolyse fermentaire ayant eu lieu, il y aura, en fin de compte, après le séjour à l'étuve

- 1) les constituants de l'urine.
- 2) le  $\beta$ -glycérophosphate non hydrolysé.
- 3) le glycérol libéré.
- 4) le phosphate libéré.

Nous constituons donc des mélanges artificiels comprenant tous les composants que nous venons d'énumérer. Pour arriver à ce résultat, nous employons les solutions suivantes :

- $\beta$ -glycérophosphate disodique M/5
- glycérol M/10
- phosphate disodique M/10.

Sur les mélanges ainsi préparés nous effectuerons trois déterminations :

- 1) phosphate minéral par la méthode de COPAUX.
- 2) glycérol par oxydation periodique sans traitement barytique.
- 3) glycérol par oxydation periodique après traitement barytique.

Les résultats obtenus sont tous indiqués en nombre de  $\text{cm}^3$  de solution M/10.

Les mélanges ont la composition suivante :

|                                                     |                      |
|-----------------------------------------------------|----------------------|
| Urine .....                                         | 20 cm <sup>3</sup>   |
| Solution de $\beta$ -glycérophosphate disodique M/5 | 10 cm <sup>3</sup>   |
| Solution de glycérol M/10.....                      | 4 cm <sup>3</sup> 75 |
| Solution de phosphate disodique M/10.....           | 5 cm <sup>3</sup>    |

Nous employons des urines de diverses heures de la journée sur lesquelles nous déterminons au préalable la teneur en phosphate minéral et en substances oxydables par l'acide periodique exprimées en glycérol.

Le tableau XIX, dans lequel les chiffres sont tous ramenés à la totalité d'un essai de 40 cm<sup>3</sup>, donne le résultat de ces recherches.

Exceptionnellement pour le mélange II, le volume total était de 50 cm<sup>3</sup> et de plus la durée de contact avec l'acide periodique a été seulement de 2 minutes, alors que pour tous les autres essais cette durée était de 20 minutes.

L'examen attentif du tableau XIX permet de tirer les conclusions suivantes : la précision est suffisante dans l'ensemble, mais il n'y a aucun intérêt à alourdir nos déterminations par une élimination barytique qui n'a apporté aucune amélioration à la précision, mais seulement une complication dans la technique.

Devant l'insuccès des recherches précédentes et l'impossibilité d'éliminer les phosphates ou les substances oxydables par l'acide periodique sans altérer la ou les phosphatases, nous nous sommes résolus à pratiquer soit le dosage du phosphore, soit celui du glycérol en faisant systématiquement un témoin constitué par l'urine ou le milieu renfermant l'enzyme sans substrat et un témoin constitué par le  $\beta$ -glycérophosphate sans diastase.

Ce principe étant admis, nous avons pratiqué le dosage du glycérol par mise en contact de l'urine et de l'acide periodique et celui du phosphore par la technique de COPAUX [14] ou celle de MISSEN [75, 76] adaptée par P. FLEURY (Recherches inédites).

Nous allons exposer ici ces méthodes en détail telles que nous les avons adaptées pour la mesure de l'activité phosphatase de l'urine afin de ne pas avoir à y revenir par la suite.

*Principe.* — Une quantité déterminée d'urine est mise en contact avec une solution de  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10 amené à pH 5,2 pendant 24 heures à 37°. Le milieu est additionné de 5 cm<sup>3</sup> de tampon acétique à pH 5,2. Au bout de ce temps, on dose soit le phosphore minéral, soit le glycérol néo-formés.

Etude de quelques urines ou mélanges artificiels avec  
ou sans traitement barytique.

| Heure d'émission<br>de l'urine                                                                    | 7 heures         |        |        |         | 11 heures        |        |        |         | 17 heures        |        |        |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------|--------|---------|------------------|--------|--------|---------|------------------|--------|--------|---------|
|                                                                                                   | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé |
| Phosphore minéral<br>exprimé en cm <sup>3</sup> de sol.<br>PO <sub>4</sub> Na <sub>3</sub> H M/10 | 12,0             | 5,0    | 18,0   | 17,0    | 3,1              | 5,0    | 3,4    | 8,1     | 5,6              | 5,0    | 10,4   | 10,6    |
| Glycérol direct exprimé<br>en cm <sup>3</sup> de sol. M/10 (1)                                    | 8,25             | 4,75   | 14,20  | 13,0    | 4,73             | 4,75   | 9,8    | 9,48    | 6,7              | 4,75   | 12,0   | 11,45   |
| Glycérol après élimination<br>barytique en cm <sup>3</sup> de sol.<br>M/10 (1)                    | 2,5              | 4,75   | 7,25   | 7,25    | 1,75             | 4,75   | 6,5    | 6,5     | 2,5              | 4,75   | 7,0    | 7,25    |
| Heure d'émission<br>de l'urine                                                                    | 19 heures        |        |        |         | Mélange I        |        |        |         | Mélange II       |        |        |         |
|                                                                                                   | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé | Urine<br>témoins | Ajouté | Trouvé | Calculé |
| Phosphore minéral<br>exprimé en cm <sup>3</sup> de sol.<br>PO <sub>4</sub> Na <sub>3</sub> H M/10 | 9,9              | 5,0    | 15,2   | 14,9    | 1,6              | 5,0    | 7,0    | 6,6     | 1,6              | 10     | 11,2   | 11,6    |
| Glycérol direct exprimé<br>en cm <sup>3</sup> de sol. M/10 (1)                                    | 3,0              | 4,75   | 12,2   | 12,75   | 3,0              | 4,75   | 7,75   | 7,75    | 2,6              | 9,5    | 12,6   | 12,1    |
| Glycérol après élimination<br>barytique en cm <sup>3</sup> de sol.<br>M/10 (1)                    | 2,0              | 4,75   | 7,4    | 6,75    | 1,0              | 4,75   | 5,75   | 5,75    | 1,0              | 9,5    | 11,25  | 10,5    |

(1) Nous exprimons en glycérol les substances oxydables par l'acide periodique.

*Technique.*

|                                                                |                           |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Urine fraîchement émise .....                                  | 10 cm <sup>3</sup>        |
| Solution de $\beta$ -glycérophosphate de sodium à pH 5,2 ..... | 10 cm <sup>3</sup>        |
| Tampon acétique à pH 5,2.....                                  | 5 cm <sup>3</sup>         |
| Eau distillée .....                                            | q.s.p. 50 cm <sup>3</sup> |

On opère dans de petits flacons de 60 cm<sup>3</sup> préalablement stérilisés et sous toluène ; on porte à l'étuve pendant 24 heures en même temps que deux témoins ainsi constitués :

|      |                                                |                    |
|------|------------------------------------------------|--------------------|
| I {  | Urine .....                                    | 10 cm <sup>3</sup> |
|      | Eau q.s.p. ....                                | 50 cm <sup>3</sup> |
| II { | Solution de $\beta$ -glycérophosphate M/5..... | 10 cm <sup>3</sup> |
|      | Eau q.s.p. ....                                | 50 cm <sup>3</sup> |

Au bout de 24 heures, on dose soit le phosphore, soit le glycérol.

I. — DOSAGE DU PHOSPHORE.

*Principe.* — Le phosphore est précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, redissous dans l'acide nitrique dilué et dosé par la technique de COPAUX [14].

*Réactifs.* — 1) Mixture magnésienne aux chlorures (Formule Treadwell) :

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| { chlorure de magnésium..... | 55 g.                 |
| { chlorure d'ammonium .....  | 105 g.                |
| { eau distillée q.s.p.....   | 1.000 cm <sup>3</sup> |

2) Acide nitrique dilué :

|                                        |                       |
|----------------------------------------|-----------------------|
| Acide nitrique pur.....(D = 1,39)..... | 250 cm <sup>3</sup>   |
| Eau distillée q.s.p.....               | 1.000 cm <sup>3</sup> |

3) Solution de molybdate de sodium :

|                                             |                       |
|---------------------------------------------|-----------------------|
| Acide molybdique pur anhydre.....           | 100 g.                |
| Carbonate neutre de sodium pur desséché.... | 60 g.                 |
| Eau distillée q.s.p. ....                   | 1.000 cm <sup>3</sup> |

On délaye l'acide molybdique dans l'eau à chaud et on ajoute le carbonate par petites fractions en attendant avant chaque nouvelle addition, que l'effervescence soit terminée.

On obtient finalement une solution limpide et stable et qui ne laisse pas déposer d'acide molybdique avec le temps.

*Technique.* — La totalité de la prise d'essai est filtrée. On lave la fiole et le filtre avec 20 cm<sup>3</sup> de mixture magnésienne. On alcalinise largement avec de l'ammoniaque en présence de

phénol-phtaléine. On laisse en repos 24 heures. On filtre le précipité de phosphate ammoniac-magnésien. On lave avec 10 cm<sup>3</sup> d'eau faiblement ammoniacale. On reprend le précipité par 20 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique dilué. On introduit la solution dans une ampoule de CORAUX. On ajoute dans l'ampoule 8 à 9 cm<sup>3</sup> d'éther en agitant vigoureusement, on ajoute alors 10 cm<sup>3</sup> de la solution de molybdate de sodium. On agite à nouveau énergiquement et on centrifuge.

On opère de même avec les témoins I et II.

*Calcul.*

Soient n, le nombre de mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> de l'essai

|                |   |   |   |              |
|----------------|---|---|---|--------------|
| n <sub>1</sub> | — | — | — | du témoin I  |
| n <sub>2</sub> | — | — | — | du témoin II |

Le nombre de milligrammes de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés par l'enzyme contenu dans 10 cc est donné par

$$N = n. - (n_1 + n_2)$$

Pratiquement l'hydrolyse dans le témoin II est insignifiante. Il est préférable que le nombre de milligrammes de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés ne dépasse pas 10 % du P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> du substrat pour se placer dans les conditions où l'on détermine la vitesse initiale d'hydrolyse.

Si l'on veut transformer le chiffre obtenu en milligrammes de phosphore il faut multiplier le résultat obtenu par 0,436.

## II. — DOSAGE DU GLYCÉROL.

*Principe.* — Le glycérol est oxydé par l'acide periodique. L'acide periodique non utilisé est réduit par l'anhydride arsénieux en excès. On opère en milieu bicarbonaté et en présence d'un peu d'iodure de potassium qui catalyse la réaction. L'excès d'anhydride arsénieux est évalué par oxydation à l'aide d'une solution décimale d'iode, P. FLEURY et J. LANGE [44].

*Réactifs.*

- 1) Solution d'acide periodique N/10 (= M/20).
- 2) Solution d'acide arsénieux bicarbonatée N/10 (formule Treadwell).
- 3) Solution d'iodure de potassium à 20 p. 100.
- 4) Solution d'iode N/10.
- 5) Solution saturée de bicarbonate de sodium (80 p. 1.000).

*Technique.* — Après avoir filtré le contenu du flacon retiré de l'étuve on en prélève 4 cm<sup>3</sup> que l'on dilue à 20 cm<sup>3</sup> par addition d'eau distillée. On neutralise le milieu par la soude

décinormale de façon que l'action ultérieure de l'acide periodique se fasse en milieu très légèrement acide. On ajoute 10 cm<sup>3</sup> de la solution N/10 d'acide periodique. On laisse en contact 15 minutes à la température du laboratoire (sans toutefois descendre au-dessous de 16°). Au bout de ce temps, on ajoute 5 à 10 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bicarbonate de sodium, puis 15 cm<sup>3</sup> de solution décinormale d'acide arsénieux et enfin 1 cm<sup>3</sup> de solution d'iodure de potassium à 20 p. 100.

On laisse en contact 15 à 20 minutes et au bout de ce temps, on titre l'excès d'acide arsénieux par l'iode décinormal. On opère de la même manière avec un témoin constitué par de l'urine seule (Témoin I comme pour le phosphore).

Pour opérer dans des conditions rigoureusement identiques, le flacon contenant la solution et le flacon contenant la prise d'essai d'urine diluée sont placés en même temps pour l'oxydation periodique, dans un bain d'eau à la température du laboratoire et retirés en même temps, car en 15 minutes l'oxydation du glycérol est terminée, mais pas celle des substances urinaires inconnues associées.

Comme on opère par différence, il n'y a pas besoin de titrer l'acide periodique, il suffit d'avoir de l'iode décinormal exact.

#### Calcul.

Soient  $V_1$  le volume d'iode N/10 utilisé pour la solution  
 $V_2$  — — — — — l'urine diluée.

L'acide periodique consommé par le glycérol libéré, par l'enzyme dans une prise d'essai de 4 cm<sup>3</sup> est

$$V = V_1 - V_2$$

Pour la totalité de la prise d'essai, soit 10 cm<sup>3</sup> d'urine, on a

$$\frac{V \times 50}{4}$$

d'autre part, l'équation de la page 42 montre qu'une molécule de glycérol exige deux molécules d'acide periodique correspondant à quatre atomes d'iode. Donc 1 cm<sup>3</sup> d'iode N/10 correspond à 1 cm<sup>3</sup> de glycérol M/40, soit 2 mg. 30 de glycérol.

Pour la prise d'essai on a donc en mg de glycérol

$$\frac{V \times 50 \times 2,3}{4} = 2,875 V$$

A la fin de ce travail, nous avons déterminé l'activité phosphatasique du sérum de sujets atteints de maladie de PAGET en vue de la comparer avec l'activité phosphatasique de l'urine. Nous avons utilisé les techniques de BODANSKY [10] et de MISSON [75, 76] adaptées par FLEURY (recherches inédites) que nous allons exposer maintenant.

La méthode de BODANSKY consiste à mettre le sérum prélevé suivant les conditions habituelles et séparé par simple centrifugation en contact avec une solution de  $\beta$ -glycérophosphate disodique tamponné à pH 8,6 pendant une heure à 37° puis à déterminer le nombre de milligrammes de phosphore libérés à partir du substrat. On rapporte ce nombre à 100 cm<sup>3</sup> de sérum.

*Substrat.*

|                                          |                     |
|------------------------------------------|---------------------|
| $\beta$ -glycérophosphate de sodium..... | 2 g. 50             |
| diethylbarbiturate monosodique .....     | 2 g. 12             |
| eau distillée q.s.p.....                 | 500 cm <sup>3</sup> |

Conserver dans un flacon émeri jaune sous une couche d'éther de pétrole ou de toluène (3 cm<sup>3</sup>).

*Dosage.* — Dans un grand tube à centrifuger introduire :

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| Substrat ..... | 20 cm <sup>3</sup> . |
|----------------|----------------------|

Porter à l'étuve à 37° pendant 15 minutes, de façon à réaliser l'équilibre de température, puis ajouter :

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| Sérum clair ..... | 2 cm <sup>3</sup> . |
|-------------------|---------------------|

Maintenir le tout à l'étuve à 37° pendant 1 heure en ayant soin d'agiter de temps en temps. Au bout d'une heure, refroidir rapidement le tube en le plongeant dans l'eau glacée et déféquer les protéines et inactiver la diastase par :

|                                         |                      |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Acide trichloracétique à 20 p. 100..... | 10 cm <sup>3</sup> . |
|-----------------------------------------|----------------------|

Agiter, centrifuger. Prélever 8 cm<sup>3</sup> (qui correspondent à 0 cm<sup>3</sup> 25 de sérum) sur lesquels on fera le dosage du phosphore en suivant exactement la technique de MISSEN adaptée par P. FLEURY. On obtient un nombre  $n$ .

On a effectué simultanément les mêmes opérations dans un autre tube bouché, porté à l'étuve le même temps, contenant les mêmes quantités de réactif et dans lequel on a remplacé les 2 cm<sup>3</sup> de sérum par 2 cm<sup>3</sup> d'eau distillée : on obtient ainsi un second chiffre  $n'$

$$n - n' = N$$

Par ailleurs on dose le phosphore minéral sur 5 cm<sup>3</sup> de sérum déféqué au 1/2 et on obtient pour 0 cm<sup>3</sup> 25 de sérum un chiffre  $N_1$ .

Le nombre de milligrammes de phosphore libérés par 100 cm<sup>3</sup> de sérum, c'est-à-dire le nombre d'unités BODANSKY est donné par :

$$(N - N_1) \times 400$$

*Résultats.*

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| Adultes normaux ..... | 1,5 à 4 unités. |
| Enfants normaux ..... | 5 à 12 unités.  |

DOSAGE DU PHOSPHORE PAR LA MÉTHODE DE MISSON  
ADAPTÉE PAR F. FLEURY.

*Principe.* — En mélangeant une solution de phosphate suffisamment diluée avec un réactif nitromolybdovanadique, on obtient une coloration jaune très sensible et très stable se développant en 1 à 2 minutes et se prêtant à un dosage colorimétrique.

*Réactifs.*

1) Solution de molybdate d'ammonium :

|                                    |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| Molybdate d'ammonium .....         | 100 g.                 |
| Soluté officinal d'ammoniaque..... | 10 cm <sup>3</sup> (1) |
| Eau distillée q.s.p.....           | 1.000 cm <sup>3</sup>  |

2) Solution de Vanadate d'ammonium (M/50) :

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| Vanadate d'ammonium ..... | 2 g. 345 |
|---------------------------|----------|

Dissoudre à chaud dans :

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Eau distillée ..... | 500 cm <sup>3</sup> |
|---------------------|---------------------|

Refroidir. Verser lentement en agitant le mélange

|                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Acide nitrique D = 1,33 (36°B)..... | 10 cm <sup>3</sup> |
| Eau .....                           | 10 cm <sup>3</sup> |

ou

|                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Acide nitrique D = 1,38 (40°B)..... | 7 cm <sup>3</sup>  |
| Eau .....                           | 13 cm <sup>3</sup> |

Le précipité rouge produit au début de l'addition d'acide nitrique, se redissout ensuite par agitation convenable dans l'excès de réactif (sauf parfois quelques légers flocons).

Compléter ensuite à 1.000 cm<sup>3</sup>.

3) Acide nitrique dilué :

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| Acide nitrique 40°B ..... | 1 volume.  |
| Eau distillée .....       | 2 volumes. |

ou

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| Acide nitrique 36°B ..... | 460 cm <sup>3</sup> .   |
| Eau distillée q.s.p.....  | 1.000 cm <sup>3</sup> . |

4) Solution titrée à 1 mg. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> par cm<sup>3</sup> :

|                                                              |                       |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Phosphate monopotassique PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> ... | 1 g. 915              |
| Eau q.s.p. ....                                              | 1.000 cm <sup>3</sup> |

On utilise cette solution pure ou diluée au 1/10°.

(1) Assure la conservation de la solution pendant plusieurs mois.

*Mode opératoire.* — Dand une fiole jaugée de 20 cm<sup>3</sup>, on mesure successivement :

|                            |                               |
|----------------------------|-------------------------------|
| Solution à doser.....      | 10 cm <sup>3</sup> .          |
| Acide nitrique dilué.....  | 4 cm <sup>3</sup> .           |
| Solution de vanadate.....  | 2 cm <sup>3</sup> . (Pipette) |
| Solution de molybdate..... | 2 cm <sup>3</sup> .           |
| Eau q.s.p. ....            | 20 cm <sup>3</sup> .          |

Au bout de 2 à 3 minutes on fait la mesure à l'électrophotomètre de MEUNIER ou au colorimètre de DUBOSQ. Dans ces conditions le poids de phosphate exprimé en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> à mettre en œuvre dans les 10 cm<sup>3</sup> de solution à doser doit être compris entre 0,1 et 1 mg.

*Calcul.* — On se rapporte à une courbe d'étalonnage ou on fait la lecture au colorimètre de DUBOSQ.

---

## CHAPITRE IV.

---

### ETUDE DIRECTE DE LA PHOSPHATASE URINAIRE.

---

Notre étude de la phosphatase urinaire va comprendre deux formes d'étude bien distinctes, d'une part, étude de l'élimination journalière de la phosphatase, étude pour laquelle nous opérons directement sur l'urine, d'autre part, étude des propriétés générales de cette phosphatase sur une poudre active obtenue à partir de l'urine.

Les dosages sont effectués en général par les deux techniques : déterminations du phosphore et du glycérol, mais pour ne pas surcharger le texte et faciliter la compréhension de nos résultats, tous les chiffres (à quelques exceptions près) correspondront à des pourcentages d'hydrolyse.

Pour exposer les résultats obtenus au cours de cette partie de nos recherches, nous suivrons le plan suivant : dans ce chapitre nous étudierons l'élimination au cours de la journée chez l'Homme et chez la Femme directement sur l'urine après avoir fixé au préalable le pH optimum d'action de la diastase. En terminant, nous décrirons nos essais de purification de la phosphatase urinaire. Dans le chapitre suivant, nous examinerons les propriétés générales de divers échantillons de phosphatase urinaire relarguée.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous nous attacherons à un cas particulier : la phosphatase urinaire dans la maladie de PAGET.

#### pH optimum.

Le premier facteur à déterminer afin de poursuivre l'étude de la phosphatase urinaire est le pH optimum d'action. Nous avons fait plusieurs séries d'essais que nous plaçons à l'étuve à 37° pendant 24 heures en flacons stériles et sous toluène. La moyenne de ces divers essais a donné les résultats exposés dans le tableau XX.

La courbe de la figure 1 rend compte encore plus clairement des résultats obtenus.

L'examen de la figure 1 et du tableau XX montre une zone optima de pH entre 4,5 et 5,5 avec un maximum très net à pH 5,2 et ensuite une activité insignifiante. Pour les pH plus

TABLEAU XX.

pH optimum de la phosphatase urinaire.

|                                                  |                      |
|--------------------------------------------------|----------------------|
| Urine .....                                      | 10 cm <sup>3</sup> . |
| $\beta$ -glycérophosphate disodique M/5.....     | 10 cm <sup>3</sup> . |
| SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> ou OHNa N/10..... | variable.            |
| Eau q.s.p. ....                                  | 50 cm <sup>3</sup> . |

| pH.                     | 3,6 | 4,5 | 4,7  | 5    | 5,2  | 5,7   | 6,6 | 7,2 | 9,2 | 9,5 |
|-------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-----|-----|-----|-----|
| Pourcentage d'hydrolyse | 0   | 9,7 | 11,4 | 15,7 | 17,4 | 11,25 | 2,1 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |

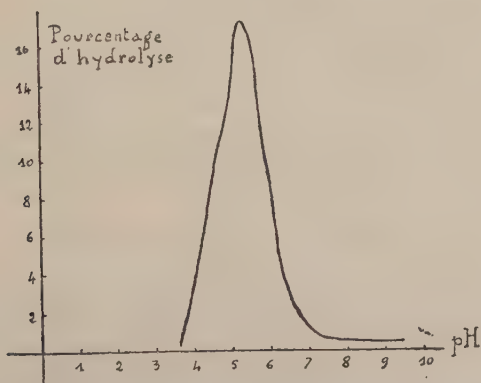


Figure 1. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de la phosphatase d'un mélange d'urines.

acides que 4,5, il y a inactivation totale. En aucun cas nous n'avons trouvé d'activité marquée dans la zone alcaline vers pH 9, bien que quelques auteurs aient signalé une activité phosphatasique dans cette zone comme nous l'avons indiqué dans un précédent chapitre.

#### Influence de la conservation de l'urine.

Nous avons cherché l'influence de la conservation de l'urine sur l'activité phosphatasique. Nous avons choisi quatre échantillons différents d'urine qui au pH optimum 5,2 nous ont donné les pourcentages d'hydrolyse suivants, 24 heures après leur

émission : 19 p. 100, 30 p. 100, 20 p. 100, 33 p. 100. Pendant dix jours, ces urines ont été conservées à la glacière en présence de quelques gouttes de toluène ; au bout de ce temps, nous avons obtenu respectivement les pourcentages suivants : 19 p. 100, 30 p. 100, 15 p. 100 et 28 p. 100.

Hors le cas du 3<sup>e</sup> échantillon, qui était une urine émise à 14 heures, les 3 autres ayant été émises à 7 heures du matin, pour lequel nous constatons une baisse d'activité de 25 p. 100, nous observons une activité entièrement ou presque entièrement conservée et nous sommes en cela d'accord avec DMOCHOWSKI [29].

A ce moment, les petites quantités d'urine qui restent sont mélangées et reportées à la glacière. Au bout de 5 jours, une détermination de l'activité phosphatasique de ce mélange nous donne une hydrolyse de 14 p. 100.

Le reste du mélange est encore reporté à la glacière et au bout d'un mois nous mesurons son activité. Nous trouvons alors le chiffre 7 p. 100.

Pendant un certain temps l'activité est à peu près complètement conservée, puis dans la suite, cette activité baisse d'une façon très notable pour s'annuler complètement après une période de quelques mois. Nous ferons toutefois remarquer que les échantillons ont été mélangés pour les expériences de longue durée.

### **Elimination au cours de la journée.**

Après avoir déterminé le pH optimum, nous avons ensuite étudié les variations de l'élimination de la phosphatase au cours de la journée chez divers sujets masculins ou féminins. Nous avons suivi cette élimination chez deux sujets masculins et deux sujets féminins normaux ayant une alimentation aussi normale que les circonstances l'ont permis.

Le tableau XXI rend compte des résultats obtenus. Comme on le voit d'après ces chiffres et ceci vient confirmer ce que certains auteurs [29] avaient déjà signalé, l'élimination durant la journée ne semble pas obéir à des lois très strictes. En particulier, l'urine du réveil qui est considérée, à juste titre d'ailleurs, comme la plus riche en substances dissoutes n'est pas ici la plus active.

D'une manière générale, après un délai plus ou moins long après un repas, il y a augmentation de l'activité et au contraire diminution après une période de jeûne. C'est ainsi que d'une façon régulière aussi bien chez les sujets masculins que féminins, il y a une baisse notable de l'activité vers 18 heures. C'est évidemment la période de la journée la plus éloignée de l'absorption d'aliments. L'urine émise à 7 heures du matin est beaucoup

plus éloignée de toute ingestion d'aliments, mais l'élimination urinaire nocturne fournit un faible volume d'urine concentrée, c'est ce qui explique que l'urine émise à cette heure soit toujours très active.

TABLEAU XXI.

Elimination de la phosphatase au cours des 24 heures  
chez 2 sujets masculins et 2 sujets féminins.

Urine ..... 10 cm<sup>3</sup>.  
 $\beta$ -glycérophosphate M/5 à pH 5,2..... 10 cm<sup>3</sup>.  
 Tampon acétique à pH 5,2..... 5 cm<sup>3</sup>.  
 Eau q.s.p. .... 50 cm<sup>3</sup>.

4 jours à 37°.

1<sup>er</sup> Sujet HOMME

| Heure<br>d'émission                              | 7     | 10    | 14   | 17   | 21   |
|--------------------------------------------------|-------|-------|------|------|------|
| Volume émis<br>en cm <sup>3</sup>                | 360   | 225   | 220  | 110  | 160  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> en gr.<br>p. 1.000 | 3,20  | 1,10  | 1,90 | 2,90 | 3,20 |
| Hydrolyse<br>%                                   | 58,45 | 65,31 | 74,6 | 53,5 | 59,3 |

2<sup>e</sup> Sujet HOMME

| Heure<br>d'émission                              | 2    | 8    | 10   | 12   | 14  | 16   | 18   | 20   | 23   |
|--------------------------------------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|
| Volume émis<br>en cm <sup>3</sup>                | 250  | 260  | 60   | 140  | 110 | 165  | 250  | 180  | 160  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> en gr.<br>p. 1.000 | 1,0  | 1,0  | 1,8  | 2,2  | 2,8 | 1,7  | 1,0  | 2,25 | 2,0  |
| Pourcentage<br>d'hydrolyse                       | 31,4 | 38,6 | 59,3 | 21,4 | 20  | 23,5 | 15,7 | 23   | 34,3 |

1<sup>er</sup> Sujet FEMME

| Heure d'émission                              | 7    | 12   | 17  | 19   | 22   |
|-----------------------------------------------|------|------|-----|------|------|
| Volume émis en cm <sup>3</sup>                | 450  | 210  | 225 | 210  | 300  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> en gr. p. 1.000 | 0,90 | 1,10 | 2,0 | 0,8  | 0,9  |
| Pourcentage d'hydrolyse                       | 20,0 | 26,4 | 2,0 | 24,3 | 12,1 |

2<sup>e</sup> Sujet FEMME

| Heure d'émission                              | 7   | 11   | 14   | 19   | 20   | 22   |
|-----------------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|
| Volume émis en cm <sup>3</sup>                | 450 | 45   | 200  | 235  | 70   | 155  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> en gr. p. 1.000 | 1,1 | 1,3  | 1,2  | 1,4  | 2,6  | 1,0  |
| Pourcentage d'hydrolyse                       | 35  | 20,7 | 25,7 | 18,5 | 21,4 | 17,1 |

La teneur en phosphore minéral de l'urine ne semble pas influencer l'activité phosphatasique et en particulier certains échantillons riches en phosphore minéral se sont aussi montrés très actifs au point de vue phosphatasique, alors qu'on aurait pu s'attendre au contraire car les phosphates sont des inhibiteurs généraux de toutes les phosphatases.

A la suite de ces essais, nous avons pensé que pour continuer l'étude de la phosphatase, il nous fallait une certaine quantité de matière stable et toujours identique à elle-même. Nous avons tenté de sortir la phosphatase du mélange complexe qui est l'urine et essayé d'avoir une poudre fermentaire active analogue à l'émulsine par exemple ; nous allons maintenant examiner les différents essais faits dans ce sens et voir comment nous avons résolu ce problème.

## Essais de purification de la phosphatase urinaire.

### Préadsorption — Relargage.

La défécation par le phosphate de plomb naissant ou préadsorption (voradsorption) de KRAUT et PANTSCHENKO-JUREWICZ [59] permet d'éliminer dans certaines préparations fermentaires un certain nombre d'impuretés, la diastase reste en solution. Cette technique a donné à ces deux auteurs de bons résultats dans l'étude de l'estérase hépatique. Appliquant cette technique aux phosphatases BAMANN et SALZER [7] ont éliminé en partie la phosphatase hépatique A<sub>2</sub>, la phosphatase A<sub>3</sub> isodynamique associée demeure en solution.

Avec la phosphatase A<sub>2</sub> d'amandes on obtient une préparation assez pure, J. COURROIS [18].

Nous avons essayé d'éliminer par addition d'acétate neutre de plomb à la fois les phosphates inhibiteurs généraux de toutes les phosphatases et les impuretés entraînées par ce précipité. Nos essais n'ont pas été satisfaisants.

Nous avons utilisé pour déféquer l'urine la solution suivante :

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Acétate neutre de plomb..... | 10 gr.                       |
| Acide acétique N/10.....     | q.s.p. 100 cm <sup>3</sup> . |

Nous suivons le protocole suivant :

|                           |                      |
|---------------------------|----------------------|
| Urine .....               | 20 cm <sup>3</sup> . |
| Solution déféquante ..... | 2 cm <sup>3</sup> .  |

Nous filtrons. Dans le filtrat nous éliminons l'excès de plomb avec quelques cristaux de sulfate de sodium. Après une nouvelle filtration nous obtenons un filtrat que nous appelons filtrat A. Le précipité, résultat de la défécation, est conservé et appelé précipité A.

Dans un flacon de 60 cm<sup>3</sup> stérile nous introduisons :

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| Filtrat A .....                           | la totalité.         |
| β-glycérophosphate disodique M/5 à pH 5,2 | 10 cm <sup>3</sup> . |
| Tampon acétique à pH 5,2.....             | 5 cm <sup>3</sup> .  |
| Eau distillée q.s.p.....                  | 50 cm <sup>3</sup> . |

Après 4 jours à 37° la diastase a libéré 1 mg. 5 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le précipité A que nous avons conservé est mis en suspension dans 20 cm<sup>3</sup> d'eau distillée dans un petit erlenmeyer. Nous éliminons la totalité du plomb par un lent courant d'hydrogène sulfuré bulle à bulle. Ceci fait, nous filtrons et éliminons l'hydrogène sulfuré par barbotage d'un courant d'air sous pression réduite. Ce soluté limpide ainsi obtenu est mélangé à :

|                                             |                      |
|---------------------------------------------|----------------------|
| β-glycérophosphate disodique M/5 à pH 5,2.. | 10 cm <sup>3</sup> . |
| Tampon acétique à pH 5,2.....               | 5 cm <sup>3</sup> .  |
| Eau distillée q.s.p. ....                   | 50 cm <sup>3</sup> . |

Après 4 jours à 37° nous obtenons un chiffre de 17 mg. 5 en  $P_2O_5$ . Dans le même temps, nous avons fait un certain nombre de dosages témoins pour connaître l'activité phosphatasique de l'urine et sa teneur en phosphore. En outre, nous avons déféqué la même quantité d'urine que celle employée pour obtenir le filtrat et le précipité A. Nous obtenons un filtrat et un précipité B que nous soumettons aux mêmes opérations que A, mais en substituant au  $\beta$ -glycérophosphate de l'eau distillée. Ces derniers dosages vont nous renseigner sur la teneur en phosphore du précipité plombique et nous permettre de savoir si le chiffre trouvé pour le précipité A est dû à la phosphatase ou seulement au phosphore minéral préexistant dans l'urine. Le tableau XXII résume ces résultats.

TABLEAU XXII.

Essai de préadsorption au phosphate de plomb naissant.

|            | $P_2O_5$ minéral<br>en mg. pour<br>20 cm <sup>3</sup> | Pourcentage<br>d'hydrolyse |
|------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|
| Urine pure | 17                                                    | 41,4                       |
| Filtrat A  | 0                                                     | 1                          |
| Filtrat B  | 16                                                    | 1                          |

De l'examen comparatif de tous ces chiffres il ressort qu'à la suite de la défécation, la phosphatase urinaire très fragile n'est pas restée en solution ; elle n'est pas davantage fixée par le précipité plombique ou très peu puisqu'il n'y a plus que 1 p. 100 d'hydrolyse dans les deux au lieu de 41,4 p. 100 sur l'urine pure.

Pour compléter cet essai, nous avons entrepris un autre identique en ajoutant de l'émulsine d'Amande douce. La phosphatase  $A_2$  que contient cette préparation fermentaire n'est pas fixée par préadsorption J. COURTOIS [18]. Nous avons voulu rechercher si la préadsorption dans le milieu urinaire plus complexe fixait cette diastase.

En reprenant la terminologie précédente, nous obtenons le filtrat C et le précipité C pour une préparation initiale ainsi constituée :

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Urine .....                           | 20 cm3.  |
| Suspension d'émulsine à 1 p. 100..... | 5 cm3.   |
| Solution déféquante .....             | 2 cm3. 5 |

Nous faisons subir à ces deux fractions les mêmes opérations que dans la première série d'essais et nous obtenons ici une hydrolyse de 5 p. 100 pour le filtrat C et de 2 p. 100 pour le précipité C. La phosphatase de l'émulsine, moins fragile, n'a pas été détruite : elle est restée en grande partie en solution.

C'est alors que nous avons eu l'idée de nous adresser à la méthode appliquée par LACHAUX [66] à la séparation des substances peu solubles normalement ou anormalement présentes dans l'urine. Cet auteur indique dans un essai qu'il a pu relarguer par le sulfate d'ammonium la phosphatase urinaire. Nous avons tiré parti de l'observation de LACHAUX, DMOCHOWSKI et PRACOWITY [31] ont également utilisé le relargage au sulfate d'ammonium pour purifier la phosphatase du sperme qui a les mêmes caractères que celle de la prostate. Enfin KUTSCHER et PANY [61] ont aussi purifié la phosphatase prostatique par fractionnement au sulfate d'ammonium.

Dans une première série d'expériences, nous nous sommes attachés à voir si le relargage entraîne la phosphatase et si on peut obtenir de cette façon une préparation stable. Nous avons pris des urines différentes et sur chacune d'elles nous étudierons l'activité phosphatasique. Puis nous opérons le relargage de ces urines en suivant la technique ci-dessous que nous eûmes à peine besoin de modifier par la suite.

A 100 cm<sup>3</sup> d'urine, nous ajoutons progressivement environ 70 g. de sulfate d'ammonium cristallisé, et pulvérisé aussi finement que possible. Quand la solution est saturée, nous portons à la glacière pendant un temps variable qui a été dans ce cas de 60 heures. Au bout de ce temps, nous filtrons sur un entonnoir de BUCHNER sous pression réduite. Le petit précipité recueilli est remis en suspension dans le même volume d'eau distillée que celui d'urine et c'est cette suspension qui sert de source diastasique.

Tous ces essais ont été faits dans la zone optimum vers pH 6. Enfin, nous avons également déterminé l'activité phosphatasique du liquide filtré. En suivant le protocole habituel, nous avons obtenu les résultats exposés dans le tableau XXIII.

En ajoutant au liquide filtré une préparation diastasique nous avons pu constater que le sulfate d'ammonium n'exerçait pas une action complètement inhibitrice.

Ce qui frappe immédiatement, c'est que, exception faite de la première urine, le relargage s'accompagne d'une diminution d'activité phosphatasique d'environ 50 p. 100.

Cette baisse d'activité n'a rien qui puisse surprendre, car elle est générale dans toutes les purifications de diastases.

TABLEAU XXIII.  
Activité d'échantillons obtenus par relargage à pH 6  
et comparaison avec l'urine.

|              | Pourcentage<br>d'hydrolyse de<br>l'urine pure | Pourcentage<br>d'hydrolyse du<br>relargat | Pourcentage<br>d'hydrolyse du<br>filtrat |
|--------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| Urine 1..... | 19                                            | 17                                        | 0                                        |
| Urine 2..... | 30                                            | 18                                        | 0                                        |
| Urine 3..... | 20                                            | 11                                        | 0                                        |
| Urine 4..... | 33                                            | 16                                        | 0                                        |

En vue de savoir si la suspension de relargat gardait son activité phosphatasique par conservation, nous avons maintenu le mélange des quatre suspensions précédentes à la glacière sous toluène pendant 10 jours. Au bout de ce temps, il s'est formé un abondant précipité floconneux : nous déterminons alors l'activité phosphatasique

- a) dans le précipité remis en suspension,
- b) dans le filtrat.

Dans le premier cas, nous obtenons une hydrolyse de 11 p. 100 et dans le second une hydrolyse nulle. C'est donc le précipité qui est actif. Cette conservation est déjà appréciable, mais nous améliorerons considérablement cette durée comme nous le verrons plus loin.

Un corps est d'autant plus facilement relargable qu'il est moins soluble, dans le cas des protéines cette solubilité diminue lorsqu'on se rapproche du point isoélectrique qui est en général pour une zone faiblement acide. Le relargage des protéines se trouve ainsi fonction du pH. Considérant que la phosphatase urinaire se comportait comme un protide, nous avons étudié l'influence du pH du milieu sur le relargage par le sulfate d'ammonium. Nous avons relargué à plusieurs pH différents un mélange d'urines qui nous avait donné directement dans les conditions habituelles et au pH optimum une hydrolyse de 16 p. 100.

Nous avons remarqué dans de nombreux cas que c'est au voisinage de pH 6 que le précipité est le plus abondant, il en est de même pour l'hydrolyse qui dans le cas du mélange d'urines ci-dessus est de 12 p. 100, alors qu'aux autres pH on obtient un précipité très peu abondant et ne jouissant pas de propriétés phosphatasiques.

Le pH 6 a été obtenu par simple mélange de l'urine et du sulfate d'ammonium. C'est en général toujours ainsi que nous avons opéré. Toutefois, dans quelques cas assez rares où le mélange urine-sulfate d'ammonium avait un pH inférieur ou supérieur à 6, le fait de le ramener aux environs de ce chiffre a toujours suffi pour amener la formation ultérieure d'un précipité doué de propriétés phosphatasiques. Dans d'autres essais de relargage à pH 5,4, 7,2 et 8 le précipité est peu abondant et n'a aucune activité phosphatasique.

C'est à la suite de tous ces essais que nous avons tenté d'obtenir une préparation stable, facile à conserver et nous permettant de faire l'étude de la phosphatase urinaire et de ses propriétés. Le précipité obtenu est séparé par filtration sous pression réduite comme précédemment, puis recueilli dans un petit cristalliseur en verre de Bohême et séché dans le vide sulfurique. Après pulvérisation nous obtenons un produit brun plus ou moins foncé à allure poudreuse, à odeur caractéristique rappelant celle toute particulière que prend l'urine après addition de sulfate d'ammonium et déjà signalée par LACHAUX [66]. Cette poudre est incomplètement soluble dans l'eau. Elle ne renferme pas de phosphore minéral et très peu de substances oxydables par l'acide periodique. En aucun cas, nous n'avons pu obtenir sur cette poudre les réactions des substances protidiques. Un titrage direct à l'iode en milieu bicarbonaté de la suspension de relargat nous a toujours donné des chiffres inférieurs à ceux correspondant à la quantité d'acide urique contenue dans une quantité équivalente d'urine.

Le rendement est assez constant et en moyenne de 1 g. 75 p. 1.000 : toutefois, nous avons obtenu les deux chiffres extrêmes de 0 g. 68 p. 1.000 et 3 g. 60 p. 1.000. De plus, le rendement est sensiblement identique chez l'Homme et chez la Femme. C'est avec des poudres ainsi préparées que nous avons fait tous les essais dans le chapitre suivant et qui vont nous renseigner sur la nature de la phosphatase urinaire et sur la place à lui donner dans la classification de FOLLEY et KAY [48].

Avant d'exposer les résultats de cette étude systématique, comme nous avons été frappés de l'abaissement d'activité entre l'urine pure et le relargat, nous nous sommes demandé s'il n'existait pas dans l'urine un activateur, qui ne se trouvant plus dans le relargat, ne pouvait plus jouer son rôle. Nous inactivons

alors une certaine quantité d'urine par chauffage de 30' au bain-marie bouillant et nous ajoutons des quantités croissantes de cette urine inactivée à des mélanges habituels avec de la suspension de relargat.

Non seulement nous n'avons jamais eu d'activation, mais l'urine a une action inhibitrice que nous attribuons aux phosphates minéraux de cette urine et nous avons en général des hydrolyses moitié plus faibles que dans les essais où nous n'ajoutons pas d'urine inactivée.

La différence d'activité entre l'urine et le relargat provient donc probablement d'une inactivation partielle due aux traitements subis dans la préparation de la poudre fermentaire.

---

## CHAPITRE V.

### PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DE DIVERS ECHANTILLONS DE PHOSPHATASE URINAIRE RELARGUÉE.

#### I. — pH optimum — action sur les $\alpha$ et $\beta$ -glycérophosphates.

Dans cette étude du pH optimum, nous avons étudié successivement l'urine d'homme et de femme. Comme certains auteurs ont considéré que la phosphatase masculine était d'origine uniquement prostatique, nous avons également étudié les relargats d'urine recueillie par cystostomie et d'une urine d'un individu ayant subi l'ablation de la prostate.

Tout d'abord nous avons examiné un relargat provenant d'un mélange d'urines émises à diverses heures. Nous obtenons un hydrolyse maximum à pH 5,2 pour le  $\beta$ -glycérophosphate disodique.

À titre documentaire, nous donnons dans le tableau XXIV les chiffres obtenus et la courbe de la figure 2 donne l'allure générale de la marche de l'hydrolyse en fonction du pH.

TABLEAU XXIV

pH optimum du relargat d'un mélange d'urines  
sur le  $\beta$ -glycérophosphate.

10 cm<sup>3</sup> de suspension fermentaire à 0 g. 60 p. 100 réagissent sur 10 cm<sup>3</sup> de substrat M/5 en présence d'eau et d'acide sulfurique N.

(Volume total : 50 cm<sup>3</sup> — 24 heures à 37°).

| pH                                              | 3,6  | 4,7 | 5,2 | 5,6  | 6,2  | 6,7 | 7   | 8,2 | 9   |
|-------------------------------------------------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| mg. de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>libérés | 0,75 | 1,0 | 7,5 | 5,75 | 2,75 | 1,5 | 1,0 | 0,5 | 0,5 |

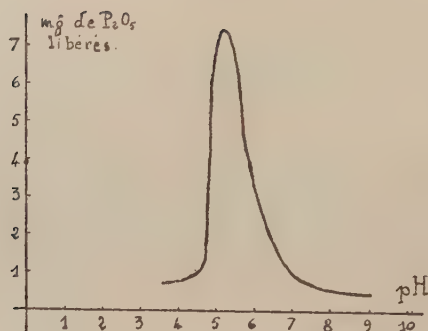


Figure 2. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de la phosphatase relarguée.

#### a) Chez l'Homme.

Nous avons opéré dans les conditions habituelles, mais en portant la durée d'hydrolyse à 4 jours. La source de diastase est fournie par 10 cm<sup>3</sup> de suspension à 1 p. 100 de relargat. Nous avons étudié des mélanges d'urines de deux sujets sains. Nous avons opéré séparément sur des échantillons d'urines émises à 7 heures, 10 heures, 14 heures, 18 heures et 21 heures : nous avons fait réagir les relargats obtenus sur des solutions d' $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates.

Le tableau XXV résume l'ensemble des résultats obtenus illustrés par les courbes des figures 3 et 4, une courbe pour l' $\alpha$ -glycérophosphate et une courbe pour le  $\beta$ . Nous n'avons donné que les courbes se rapportant à l'urine de 7 heures du matin, toutes les autres courbes ont une allure analogue.

Comme nous l'avons déjà constaté dans l'étude de l'élimination journalière, les chiffres sont très variables aux diverses heures de la journée. D'autre part, d'une façon générale, la diastase hydrolyse le  $\beta$ -glycérophosphate disodique plus rapidement que l' $\alpha$ , quelle que soit l'heure du prélèvement et le pH.

#### b) Chez la Femme.

Nous opérons dans des conditions parallèles à celles que nous venons de décrire. Le tableau XXVI et les courbes des figures 5 et 6 mettent ces résultats en évidence.

Le pH optimum est encore à 5,2, mais nous avons des variations d'activité plus considérables que chez l'homme. L'activité est également plus grande sur le  $\beta$ -glycérophosphate que sur l' $\alpha$ . Dans certains cas, le pH optimum est moins accusé que chez l'homme et on a plutôt un plateau aplati qu'un optimum très saillant,

TABLEAU XXV.

Action sur les  $\alpha$  et  $\beta$ -glycérophosphates de relargats masculins à divers pH.

| Heure d'émission | pH           | 3,4     | 4,3  | 5,2 | 5,6 | 6,2  | 6,6  | 7     | 8,2  | 9    |
|------------------|--------------|---------|------|-----|-----|------|------|-------|------|------|
| 7 heures         | $\alpha$ gl. | 0,7 (1) | 4,2  | 5   | 3,5 | 2    | 0,07 | 0,035 | 0,02 | 0,01 |
|                  | $\beta$ gl.  | 3       | 7    | 10  | 6,5 | 4,2  | 2    | 1     | 0,07 | 0    |
| 10 heures        | $\alpha$ gl. |         | 2    | 4,5 | 3,5 | 0,03 |      |       |      |      |
|                  | $\beta$ gl.  | 3       | 30   | 36  | 29  | 10   | 7    | 4,5   | 1,75 | 0,35 |
| 14 heures        | $\alpha$ gl. | 0       | 0,2  | 3,5 | 1,5 | 0,7  | 0,5  | 0,35  | 0    | 0    |
|                  | $\beta$ gl.  | 0,35    | 0,5  | 3,5 | 3   | 2    | 0,7  | 0,5   | 0,35 | 0    |
| 18 heures        | $\alpha$ gl. | 0,07    | 37,7 | 60  | 57  | 20   | 10   | 4,5   | 0,3  | 0,1  |
|                  | $\beta$ gl.  | 0,7     | 82   | 71  | 60  | 21   | 10   | 5,7   | 1,5  | 0,3  |
| 22 heures        | $\alpha$ gl. | 0,3     | 11   | 25  | 19  | 10   | 3    | 1     | 0,3  | 0    |
|                  | $\beta$ gl.  | 0,7     | 35,7 | 40  | 28  | 14   | 6,5  | 3     | 0,3  | 0    |

(1) Les chiffres indiquent le pourcentage d'hydrolyse du substrat.

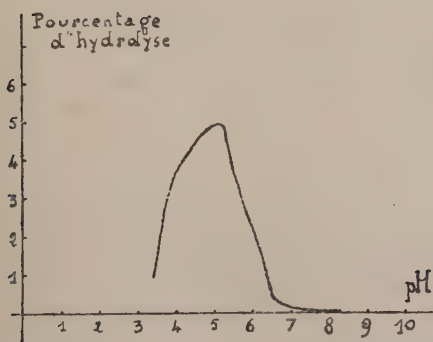


Figure 3. — Action sur l' $\alpha$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines d'Homme émises à 7 heures.

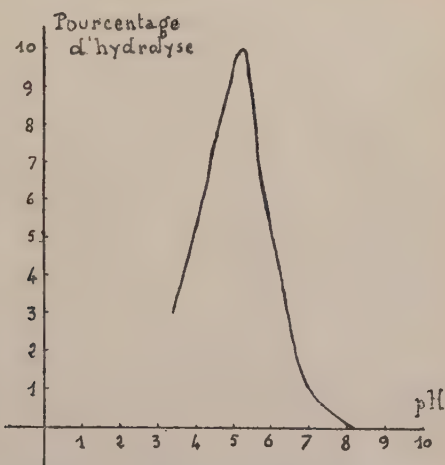


Figure 4. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines d'Homme émises à 7 heures.

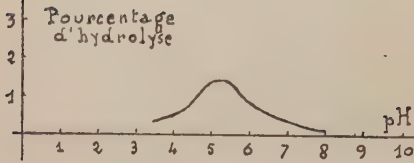


Figure 5. — Action sur l' $\alpha$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines de Femme émises à 7 heures.

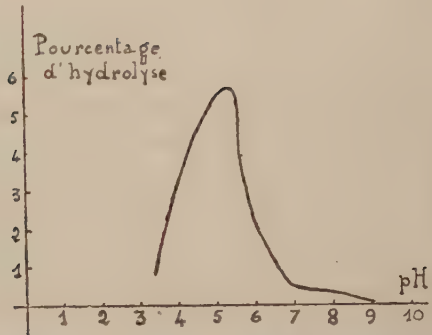


Figure 6. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines de Femme émises à 7 heures.

TABLEAU XXVI.

Activité en fonction du pH de la phosphatase d'urine de Femme extraite par relargage aux diverses heures de la journée. 10 cm<sup>3</sup> de suspension fermentaire à 1 % réagissent sur 10 cm<sup>3</sup> de glycérophosphate M/5 en présence d'eau et d'acide sulfurique N ou de soude N.

(Volume total : 50 cm<sup>3</sup> — 4 jours à 37°).

| pH        |              | 3,4      | 4,3 | 5,2  | 5,6 | 6,2 | 6,6 | 7    | 8,2  | 9   |
|-----------|--------------|----------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|-----|
| 7 heures  | $\alpha$ gl. | 0,35 (1) | 0,7 | 1,5  | 1   | 0,7 | 0,7 | 0,35 | 0    | 0   |
|           | $\beta$ gl.  | 0,7      | 4,2 | 5,7  | 2,5 | 2   | 1,4 | 0,35 | 0,35 | 0   |
| 10 heures | $\alpha$ gl. |          | 22  | 30   | 13  | 6,4 | 5   | 2    | 0,7  |     |
|           | $\beta$ gl.  |          | 37  | 42   | 32  | 10  | 5   | 3,5  | 0,7  |     |
| 14 heures | $\beta$ gl.  |          | 3   | 3,5  | 3   | 2   | 1   | 0,7  | 0,7  |     |
| 22 heures | $\alpha$ gl. | 1,5      | 7,5 | 15,5 | 15  | 14  | 10  | 4,2  | 1,4  | 0,7 |
|           | $\beta$ gl.  | 2,1      | 18  | 20   | 19  | 13  | 10  | 5    | 3,5  | 3   |

(1) Les chiffres représentent le pourcentage d'hydrolyse du substrat.

c) Urine prélevée par cystostomie.

Dans ce cas particulier, nous avons relargué la totalité des urines de 24 heures sans pouvoir faire de fractionnement. Nous avons obtenu un important précipité légèrement coloré en bleu

par le bleu de méthylène utilisé pour les lavages vésicaux. En tout cas, nous n'avons pas à craindre ici la présence de phosphatase prostatique.

Comme précédemment, les résultats obtenus sont exposés dans le tableau XXVII et nous avons également tracé les deux courbes correspondantes (figures 7 et 8).

TABLEAU XXVII.

Activité en fonction du pH de la Phosphatase d'Urine  
prélevée par cystostomie.

| pH                         |                                      | 3,4  | 4,3 | 5,2  | 5,6 | 6,2 | 6,6 | 7   | 8,2 | 9   |
|----------------------------|--------------------------------------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pourcentage<br>d'hydrolyse | $\alpha$ -glycé-<br>rophos-<br>phate | 0,07 | 3   | 12   | 15  | 8   | 5   | 4,2 | 5   | 3   |
|                            | $\beta$ -glycé-<br>rophos-<br>phate  | 0,7  | 8   | 22,5 | 25  | 10  | 7   | 5,7 | 5   | 3,5 |

Ici le pH optimum est déplacé vers la zone moins acide, mais il y a tout de même hydrolyse notable, ce qui prouve bien l'existence d'une phosphatase urinaire propre totalement indépendante de la sécrétion prostatique directe.

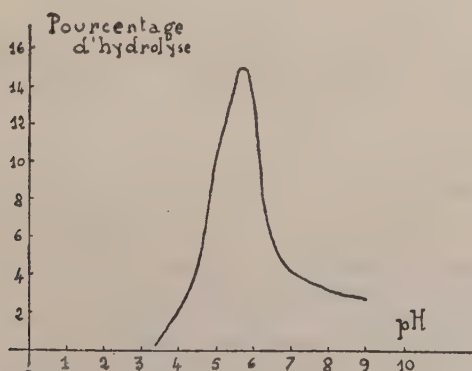


Figure 7. — Action sur l' $\alpha$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines prélevées par cystostomie.

Nous tenons à spécifier ici que par sécrétion prostatique nous entendons la sécrétion externe ; nous n'envisageons pas le cas possible où la prostate déverserait dans le sang une phosphatase éliminée ensuite au niveau du rein.

LUNDSTEEN et VERMEHREN [67] ont observé que dans le cancer de la prostate il y avait toujours une forte augmentation de la phosphatase de pH optimum 5 dans le sérum.

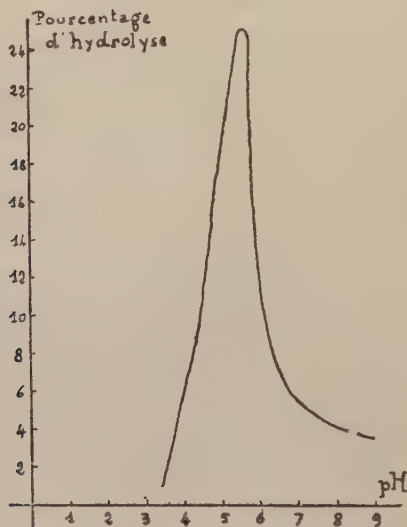


Figure 8. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines prélevées par cystostomie.

d) *Cas d'un sujet ayant subi l'ablation de la prostate.*

Ici nous n'avons étudié que l'action sur le  $\beta$ -glycérophosphate et l'urine qui a servi à l'extraction était émise en 24 heures. Là encore les résultats obtenus nous permettent de penser qu'il s'agit d'une phosphatase ayant les mêmes caractères que les précédentes (Tableau XXVIII, figure 9).

D'une manière générale, tous ces résultats plaident en faveur de l'homogénéité de la phosphatase urinaire. En aucun cas nous ne trouvons de phosphatase  $A_1$  en quantité décelable. Cependant, dans toutes les courbes après la chute brutale de l'activité de pH 5,5 à 7,0 une légère hydrolyse du substrat peut être décelée en milieu alcalin. Nous trouvons une phosphatase  $A_2$  et

TABLEAU XXVIII.

Activité en fonction du pH de la phosphatase extraite de l'urine  
d'un sujet ayant subi l'ablation de la prostate.

| pH                                                              | 3,4  | 4,3 | 5,2 | 5,6 | 6,2 | 6,6 | 7   | 8,2  | 9    |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Pourcentage<br>d'hydrolyse du<br>$\beta$ -glycérophos-<br>phate | 0,35 | 5   | 20  | 18  | 3   | 2   | 0,7 | 0,55 | 0,35 |

toujours la même. Nous en apportons pour preuve la similitude de toutes les courbes. Quelque soit le cas envisagé, nous trouvons un pH optimum situé vers 5,2 et un plateau optimum de pH 4,5 — 5,5.

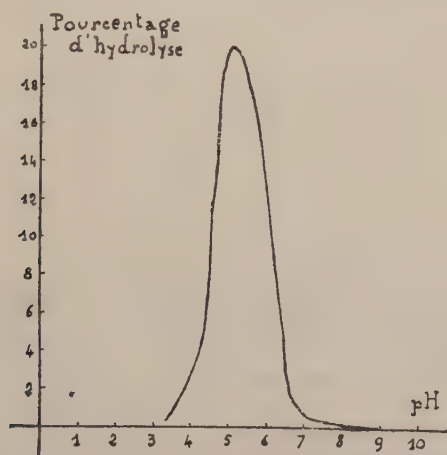


Figure 9. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de phosphatase relarguée à partir d'urines émises par un sujet prostatectomisé.

Enfin, dans tous les cas la phosphatase urinaire a hydrolysé le  $\beta$ -glycérophosphate disodique plus rapidement que l' $\alpha$  à la même concentration moléculaire, ceci quel que soit le pH ou l'origine de l'urine.

A la suite de ces résultats et de ces conclusions, il nous a paru intéressant de donner à titre de comparaison, les courbes obtenues avec le sérum agissant sur l' $\alpha$  et le  $\beta$ -glycérophosphate disodique à des pH variables.

Les conditions de ces essais ont été les suivantes :

Hydrolyse de 10 jours à 37° d'un mélange ainsi constitué :  
 Solution d' $\alpha$  ou  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/6.. 20 cm<sup>3</sup>.  
 Sérum privé d'hématies par centrifugation..... 10 cm<sup>3</sup>.  
 Acide citrique N ou soude N..... variable  
 Eau distillée q.s.p. .... 50 cm<sup>3</sup>.

Le dosage du phosphore a été effectué par la méthode de COPAUX après avoir procédé à l'élimination des protéines et séparation du phosphate à l'état de sel ammoniaco-magnésien. Cette déprotéinisation est obtenue en ajoutant au sortir de l'étuve 10 cm<sup>3</sup> d'un mélange à volumes égaux d'acétate d'ammonium et d'acide acétique officinaux et 20 cm<sup>3</sup> de mixture magnésienne et séjour de 30 minutes sur un bain-marie bouillant. Au bout de ce temps on filtre et on opère comme dans le cas classique.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIX, illustré par les figures 10 et 11.

TABLEAU XXIX.  
 Activité du sérum en fonction du pH sur les  $\alpha$   
 et  $\beta$ -glycérophosphate de sodium.

|                                                    | pH           | 4,4 | 5,3 | 5,8 | 6,8 | 7,3 | 8    | 8,5 | 9  | 9,7 |
|----------------------------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|-----|
| mg. de<br>P <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>libérés | $\alpha$ gl. | 1   | 3   | 2   | 4   | 7   | 10   | 13  | 15 | 0   |
|                                                    | $\beta$ gl.  | 3,5 | 5,6 | 3   | 4   | 7,5 | 20,5 | 15  | 14 | 1   |

Dans le sérum nous trouvons les phosphatases A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>, alors que dans l'urine seule l'A<sub>2</sub> existe. Pour la partie de la courbe intéressant la phosphatase A<sub>2</sub> il y a lieu de rapprocher l'urine et le sérum, car pour cette portion le mouvement des deux courbes est absolument identique à l'intensité de l'activité près. En effet, pour le sérum c'est surtout la phosphatase A<sub>2</sub> qui manifeste son activité à tel point que la phosphatase A<sub>1</sub> du sérum a passé inaperçue pendant un temps assez long.

Nous pouvons donc remarquer que la phosphatase A<sub>2</sub> du sérum a un pH optimum situé vers 5,3 et hydrolyse le  $\beta$ -glycérophosphate plus rapidement que l' $\alpha$ . Ces deux caractères se retrouvent avec la phosphatase urinaire.

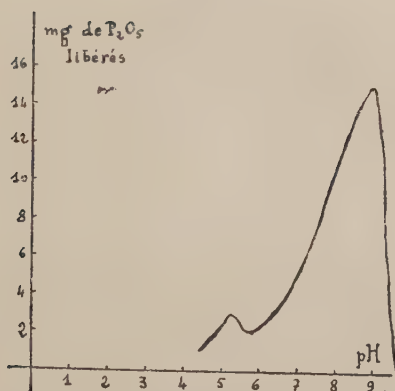


Figure 10. — Action sur l' $\alpha$ -glycérophosphate en fonction du pH de la phosphatase sérique.

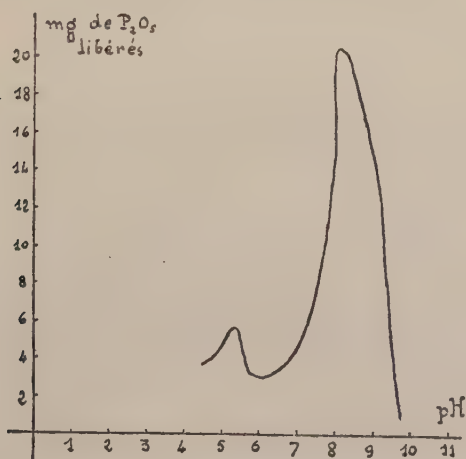


Figure 11. — Action sur le  $\beta$ -glycérophosphate en fonction du pH de la phosphatase sérique.

## II. — Activation par les sels de magnésium.

Dans cette série d'essais, nous ajoutons au milieu une certaine quantité de solution de sulfate de magnésium, de façon à obtenir en fin de compte des solutions dont la concentration en

Mg sera M/100, M/10.000, M/100.000, ce qu'on exprimera plus simplement en utilisant l'expression donnée par JENNER et KAY [57]

$$qMg = -\log Mg \quad (1)$$

ici nous prenons

$$qMg = 2, 4 \text{ et } 5$$

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux XXX et XXXI.

La phosphatase alcaline  $A_1$  est très fortement activable par les sels de magnésium, aucun de nos échantillons ne semble en renfermer car à pH 8,2 où la phosphatase est active, l'ion (Mg) n'élève en aucune façon l'insignifiante activité phosphatase observée.

Par contre, la phosphatase  $A_2$  n'est pas activable par les sels de magnésium, ces derniers l'inhibent même à partir d'une certaine concentration. Nous observons dans nos essais que l'ion (Mg) à pH 5,2 exerce sur les différents échantillons de phosphatase urinaire une faible inhibition.

TABLEAU XXX.

Activation par les sels de magnésium à pH 5,2.

| qMg    | Urine d'homme |       |       |       | Urine de femme |       |       | Urines<br>recueillies par<br>Cystostomie |
|--------|---------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|------------------------------------------|
|        | 7 h.          | 10 h. | 18 h. | 22 h. | 7 h.           | 10 h. | 22 h. | Mélange<br>de<br>24 heures               |
| 2      | 8             | 25    | 64    | 41    | 15             | 50    | 18,5  | 35                                       |
| 4      | 10            | 30    | 65    | 36,5  | 15             | 50    | 18,5  | 35                                       |
| 5      | 10            | 25    | 64    | 36,5  | 15             | 50    | 18    | 35                                       |
| témoin | 10            | 35    | 71    | 40    | 15             | 50    | 20    | 40                                       |

Les chiffres indiquent le pourcentage d'hydrolyse.

(1) Mg est la concentration moléculaire du sel de magnésium.

TABLEAU XXXI.

Activation par (Mg) à pH 8,2.

| qMg    | Urine d'homme |       |       |       | Urine de femme |       |       | Urines<br>par<br>cystostomie |
|--------|---------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|------------------------------|
|        | 7 h.          | 10 h. | 18 h. | 22 h. | 7 h.           | 10 h. | 22 h. | Mélange<br>de<br>24 heures   |
| 2      | 0,35          | 0,7   | 1,7   | 0,35  | 0,7            | 6     | 4,4   | 4,6                          |
| 4      | 0,35          | 0,7   | 1,7   | 0,35  | 0,7            | 6     | 4     | 4,6                          |
| 5      | 0,35          | 0,7   | 1,7   | 0,35  | 0,7            | 5     | 3,6   | 4,6                          |
| témoin | 0,35          | 0,7   | 1,7   | 0,35  | 0,7            | 5     | 4     | 4,5                          |

Les chiffres indiquent le pourcentage d'hydrolyse.

La phosphatase urinaire présente là un nouveau caractère commun avec d'autres phosphatases A<sub>2</sub>, celles des graines par exemple. Si nous comparons les résultats obtenus avec les divers échantillons d'urine, nous pouvons constater qu'ils se comportent de façon identique, quelle que soit l'origine : masculine, féminine, urine prélevée par cystostomie.

Ces faits plaident encore en faveur de l'homogénéité de la sécrétion phosphatasique urinaire.

### III. — Inhibition par le Fluorure de Sodium.

On a depuis longtemps remarqué, J. COURTOIS [18], que les fluorures exercent une nette action inhibitrice sur certaines phosphatases. D'une façon générale, les phosphatases à pH optimum en milieu alcalin type A<sub>1</sub> ne sont que peu ou pas inhibées. Les phosphatases à pH optimum en milieu acide A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> sont plus ou moins fortement inhibées.

Nous avons d'abord étudié l'inhibition en fonction de la concentration en fluorure. Dès le début de nos recherches sur cette question, nous nous sommes rendu compte que cette

inhibition était très forte, puisqu'en ajoutant aux doses habituelles de substrat et de  $\beta$ -glycérophosphate 10 cm<sup>3</sup> et 5 cm<sup>3</sup> de fluorure de sodium M/100 nous avons obtenu des pourcentages d'inhibition de 92 et 93 p. 100.

En présence d'une telle inhibition, nous avons étudié ce phénomène avec des doses croissantes de solution M/1.000 de fluorure de sodium. Nous avons obtenu les chiffres suivants qui montrent que la phosphatase urinaire est très sensible à l'inhibition fluorée (Tableau XXXII).

TABLEAU XXXII.

Inhibition en fonction de la concentration en fluorure.

| cm <sup>3</sup> de<br>FNa M/1000 | 0 | 1  | 2  | 5  | 10 | 20 |
|----------------------------------|---|----|----|----|----|----|
| Inhibition<br>p. 100             | 0 | 11 | 15 | 20 | 53 | 90 |

La phosphatase urinaire est plus sensible à l'inhibition fluorée que la phosphatase prostatique qui est à peine inhibée avec une concentration M/1000 en fluorure de sodium. KUTSCHER et WÖRNER [64].

#### IV. — Influence de la concentration en substrat sur l'activité phosphatasique.

La phosphatase urinaire s'est comportée jusqu'ici comme une phosphatase A<sub>2</sub>. Les phosphatases de ce type réagissent différemment vis-à-vis des fluorures selon leur origine.

Avec les phosphatases de pommes de terre, PFANKUCH [82], de moutarde blanche et d'amande douce, J. COURTOIS [19] et J. COURTOIS et J. MANOUVRIER [25], l'action inhibitrice du fluorure augmente avec la concentration du substrat. Le fluorure augmente l'affinité K<sub>M</sub>; l'affinité K<sub>M</sub> est l'inverse de la constante de MICHAELIS K<sub>m</sub>, constante de dissociation moléculaire de la combinaison diastase — substrat.

Avec la phosphatase prostatique qui a la plupart de ses propriétés analogues à celles des phosphatases végétales précitées, le mécanisme de l'inhibition fluorée est tout à fait différent. KUTSCHER et WUST — [65] — le fluorure se comporte comme un inhibiteur concurrent, il diminue l'affinité K<sub>M</sub>, ceci se traduit par le fait que l'action inhibitrice du fluorure diminue

lorsque la concentration en substrat augmente. Tout se passe comme si le fluorure fixé sur l'enzyme entrainait en concurrence avec le substrat, ce dernier à de fortes concentrations le déplaçant en vertu de la loi d'action de masse.

Nous avons cherché si la phosphatase urinaire se comportait comme les phosphatases végétales ou au contraire comme l'enzyme prostatique. Nous avons étudié l'influence de la concentration en substrat sur l'inhibition par une dose constante de fluorure.

Pour effectuer cette étude, nous avons suivi le protocole suivant : nous préparons des mélanges ayant pour composition :

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| Fluorure de sodium M/1000.....            | 10 cm <sup>3</sup> . |
| β-glycérophosphate disodique M/5 à pH 5,2 | Variable.            |
| Suspension de relargat à 1 p. 100.....    | 10 cm <sup>3</sup> . |
| Tampon acétique à pH 5,2.....             | 5 cm <sup>3</sup> .  |
| Eau q.s.p. ....                           | 50 cm <sup>3</sup> . |

Cette étude a été faite

- a) avec un mélange de relargats d'homme.
- b) avec un mélange de relargats de femme.
- c) avec un relargat d'urine prélevée par cystostomie.

Le tableau XXXIII condense les résultats obtenus ; les chiffres indiquent les pourcentages d'activité, l'hydrolyse en l'absence de fluorure étant prise égale à 100.

TABLEAU XXXIII.

Inhibition en fonction de la concentration en substrat.

| Nombre de cm <sup>3</sup><br>de Substrat | 1      | 2  | 5  | 10 | 25 |
|------------------------------------------|--------|----|----|----|----|
| Homme                                    | 70 (1) | 60 | 20 | 10 | 7  |
| Femme                                    | 88     | 90 | 86 | 70 | 35 |
| Cystostomie                              | 94     | 85 | 66 | 53 | 23 |

(1) Les chiffres indiquent les pourcentages d'activité.

La phosphatase urinaire a les mêmes caractères que celle de la prostate KUTSCHER et WUST [65], l'action inhibitrice du fluorure diminue régulièrement quand la concentration en substrat croît, le fluorure se comporte absolument comme un inhibiteur concurrent typique.

Si la phosphatase  $A_2$  excrétée par l'urine a une origine alimentaire KUTSCHER et WOLBERGS [62], elle a subi un remaniement de son support colloïdal car les phosphatases végétales se comportent différemment vis-à-vis du fluorure.

En tout cas, quelle que soit la provenance de la phosphatase : homme, femme, sujet cystostomisé, là encore le comportement est identique dans les trois cas et ceci venant s'ajouter à ce que nous avons déjà trouvé pour le pH optimum, l'action sur les glycérophosphates et l'activation par (Mg) nous permet de penser qu'il s'agit bien d'une phosphatase  $A_2$  absolument indépendante de la phosphatase prostatique.

Au cours de la réaction diastasique le substrat s'unirait avec la diastase pour donner une combinaison intermédiaire diastase-substrat permettant la transformation de ce dernier. Cette combinaison se décomposerait alors pour régénérer la diastase primitive et libérer les produits terminaux de la réaction diastasique. De nombreux travaux, et en particulier ceux de COURTOIS [18] étayent cette conception.

La déduction la plus importante tirée de la notion d'une combinaison diastase-substrat est l'étude de la dissociation de cette combinaison.

En 1913, MICHAELIS et MENTEN [74 bis] ont appliqué la loi d'action de masse à la formation de la combinaison diastase-substrat. La concentration de la combinaison diastase substrat [D. S.] est dans un rapport fixe avec le produit des concentrations [D.] en diastase et [S.] en substrat libres ; ce qui peut s'écrire en utilisant le même mode de représentation que pour les électrolytes dissociables.

$$\frac{[D.] \cdot [S.]}{[D. S.]} = K_m$$

On appelle  $K_m$  la constante de dissociation moléculaire de la combinaison diastase-substrat ou constante de MICHAELIS ; son inverse  $K_M$  exprime l'affinité de la diastase pour le substrat.

En utilisant les témoins des essais précédents, nous avons calculé l'affinité  $K_M$  pour les relargats d'urine de femme et d'urine prélevée par cystostomie.

Nos expériences ont été réalisées en opposant à 0 g. 10 de préparation fermentaire des doses variables de  $\beta$ -glycérophosphate ajusté à pH 5,2. Le volume total du mélange réactionnel est de 50 cm<sup>3</sup>. La durée d'hydrolyse à 37° est variable.

Nos résultats, groupés dans le tableau XXXIV, nous ont permis de mesurer l'affinité  $K_M$  ; pour mesurer cette dernière nous avons utilisé le mode de représentation de MICHAELIS et MENTEN où l'on porte en abscisses  $ps = (-\log. [S.])$ , S étant la concentration moléculaire du substrat et en ordonnées la vitesse initiale de réaction exprimée par la quantité de mg. de  $P_2O_5$  libérés. (Fig. 12 et 13).

TABLEAU XXXIV.

Influence de la concentration en substrat sur l'activité phosphatasique.

|                                           | Glycérophosphate exprimé en cm <sup>3</sup> sol. M/5 | Logarithme de la concentration en substrat<br>ps =<br>— Log S (1) | mg. de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> libérés |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Urines<br>prélevées<br>par<br>cystostomie | 1                                                    | 2,40                                                              | 3,0                                          |
|                                           | 2                                                    | 2,10                                                              | 4,66                                         |
|                                           | 5                                                    | 1,70                                                              | 6,0                                          |
|                                           | 10                                                   | 1,40                                                              | 10,25                                        |
|                                           | 25                                                   | 1,0                                                               | 17,6                                         |
| Urines<br>de<br>Femme                     | 1                                                    | 2,40                                                              | 4,6                                          |
|                                           | 2                                                    | 2,10                                                              | 14                                           |
|                                           | 5                                                    | 1,70                                                              | 21,5                                         |
|                                           | 10                                                   | 1,40                                                              | 41                                           |
|                                           | 25                                                   | 1,0                                                               | 48                                           |

(1) S = concentration moléculaire en substrat.

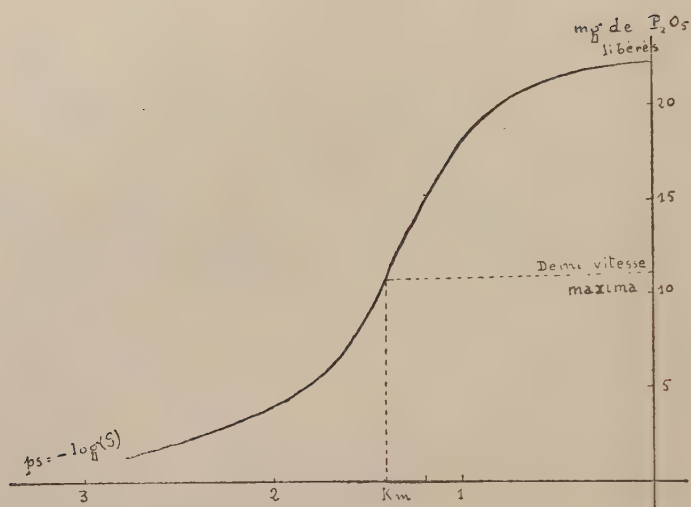


Figure 12. — Affinité pour le  $\beta$ -glycérophosphate de la phosphatase relarguée à partir d'urines prélevées par cystostomie.  
(S) = Concentration moléculaire du Substrat.

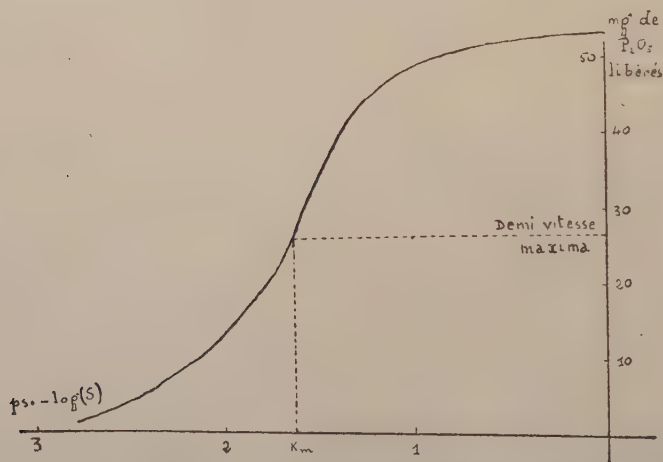


Figure 13. — Affinité pour le  $\beta$ -glycérophosphate de la phosphatase relarguée à partir d'urines de Femmes.  
(S) = Concentration moléculaire du Substrat.

Pour l'urine de femme  $K_M = 44,5$  et pour celle prélevée par cystostomie  $K_M = 25$ . Ces chiffres montrent que l'affinité de la phosphatase urinaire, indépendamment de tout apport prostatique, est du même ordre de grandeur que celle des phosphatases  $A_2$  de graines.

A pH 5,3 COURTOIS [18] a trouvé 57,1 pour la graine de Moutarde blanche et 57,1 pour la phosphatase d'Amande douce. PFANKUCH [82] a obtenu à pH 5,85 pour divers échantillons de pommes de terre 50, 55,5 et 90. KUTSCHER et WÖRNER [64] ont trouvé  $K_M = 32$  à pH 4,65 pour la phosphatase de la prostate.

Il est extrêmement intéressant de noter que l'affinité de la phosphatase prostatique  $A_2$  est très voisine de celles obtenues pour les deux préparations étudiées dont l'origine n'est évidemment pas prostatique.

Ces faits, ajoutés aux résultats déjà obtenus plus haut, nous permettent de conclure avec plus de certitude encore à l'existence d'une phosphatase urinaire  $A_2$  indépendante de la phosphatase prostatique.

#### V. — Action de la phosphatase urinaire sur d'autres dérivés phosphoriques.

Nous avons étudié l'action du relargat obtenu sur d'autres substrats. On admet que les monoesters phosphoriques sont hydrolysés par des phosphatases spécifiques : les phosphomonoestérases.

Les pyrophosphates et les diesters sont dédoublés par d'autres phosphatases distinctes : les pyrophosphatases et les phosphodiesterases. Enfin les phytinates (inosito-hexaphosphates) seraient hydrolysés par une phytase spécifique dont l'individualité reste encore incertaine, l'hydrolyse des phytinates est toujours très lente et il ne s'agit peut-être que d'un substrat très lentement attaqué par la phosphomonoestérase.

Nous avons recherché si notre relargat urinaire renfermait une pyrophosphatase, une diestérase et une phytase.

1. — PYROPHOSPHATASE. — 10 cm<sup>3</sup> de pyrophosphate de sodium M/5 amenés à pH 5,2 sont mélangés à 5 cm<sup>3</sup> de tampon acétique à pH 5,2 et 10 cm<sup>3</sup> de relargat d'urine d'homme à 1 p. 100. Le volume est amené à 50 cm<sup>3</sup> ; après 2 jours et 4 jours de contact à 37°, nous éliminons le pyrophosphate par la technique indiquée par COURTOIS et MANOUVRIER [25] : la diastase est inactivée et les protéines associées sont précipitées par chauffage sur un bain-marie avec un mélange à parties égales acide acétique-acétate d'ammonium officinaux et une solution des chlorures de magnésium et d'ammonium.

En présence du pyrophosphate non hydrolysé cette flocula-

tion des protéines s'accompagne d'une précipitation massive d'un mélange de pyrophosphate de magnésie et de magnésie. Après filtration le phosphore minéral est précipité et dosé par la technique habituelle.

En aucun cas, nous n'avons pu obtenir une différence sensible entre l'essai et le témoin permettant de conclure à la présence de pyrophosphatase ; l'hydrolyse propre du substrat rend très difficile toute interprétation. Le pyrophosphate de sodium est en effet un substrat très difficile à utiliser à cause de cette hydrolyse propre et FLEURY et COURTOIS [38] ont eu beaucoup de peine pour affirmer avoir eu une préparation de monoestérase privée de pyrophosphatase.

Au cours de ces recherches, la question de la pyrophosphatase du sang étant très controversée, nous avons fait quelques essais sur le sérum dans les mêmes conditions mais à pH 7. Au bout de 2 jours, nous avons obtenu une hydrolyse correspondant à 2 mg. de  $P_2O_5$  libéré. La prolongation du temps de contact à 5 jours et 10 jours n'a pas amélioré ce résultat.

2. — PHOSPHODIESTÉRIASE. — 5 cm<sup>3</sup> de diphenylphosphate de sodium M/10 amenés à pH 5,2 sont mélangés à 5 cm<sup>3</sup> de tampon acétique à pH 5,2 et 5 cm<sup>3</sup> de suspension à 1 p. 100 de relargat d'urine humaine. Le volume est amené à 50 cm<sup>3</sup>. Après 2 jours et 8 jours de contact à 37°, nous n'observons aucune hydrolyse notable. Nous avons répété cet essai avec 0 g. 50 d'un autre relargat d'urine très riche en phosphatase ; après 8 jours à 37° il n'y avait aucune hydrolyse notable du substrat.

Les relargats ne contiennent pas d'inhibiteur de la phosphodiesterase, car dans les conditions précédentes, 10 cm<sup>3</sup> de liquide fermentaire d'*Aspergillus orizae* préparé dans les mêmes conditions que pour la recherche de la mutase (cf. page 27) ont libéré 20 p. 100 du phosphore organique du substrat en 24 heures en présence de 0 g. 50 du premier relargat, ils en ont libérés 10 p. 100 en présence du second relargat.

Ces quelques essais nous montrent que l'urine ne paraît pas renfermer de phosphodiesterase.

L'individualité de la phosphodiesterase est surtout basée sur l'obtention de préparations de monoestérase sans action sur les diesters ; l'isolement d'une diesterase ne libérant qu'un des alcools ou phénols du diester serait un critère plus satisfaisant de l'existence d'une diesterase spécifique.

Certains auteurs ont prétendu isoler une telle diesterase de certains venins de serpent, mais ces résultats ont été controversés. Nos résultats fournissent un exemple supplémentaire d'une monoestérase sans action sur les diesters.

3. — PHYTASE. — 0 g. 50 de Phytinate de sodium préparé selon la technique de POSTERNAK [84] sont amenés à pH 5,2 par addition d'acide citrique, nous complétons à 50 cm<sup>3</sup> après avoir

mélangé à 5 cm<sup>3</sup> de tampon acétique à pH 5,2 avec 5 ctg. d'un relargat d'urine d'homme. Il n'y a eu que des traces de phosphate minéral libéré après 8 jours et 30 jours de contact à 37°. La phosphatase urinaire est donc pratiquement sans action sur l'inositohexaphosphate.

#### CONCLUSIONS DU CHAPITRE V.

Nous avons montré, à partir de préparations obtenues par relargage de l'urine en saturant celle-ci de sulfate d'ammonium, qu'il existait dans l'urine une phosphatase présentant les caractères généraux suivants :

- 1) pH optimum vers 5,2 avec comme substrats soit l' $\alpha$ , soit le  $\beta$ -glycérophosphate.
- 2) hydrolyse plus rapide du  $\beta$ -glycérophosphate que de l' $\alpha$ .
- 3) aucune activation par l'ion magnésium.
- 4) inhibition par le fluorure de sodium inversement proportionnelle à la concentration du substrat.

Ces caractères permettent de ranger la phosphatase urinaire dans le groupe A<sub>2</sub> de la classification des phosphatases.

De plus, la phosphatase urinaire normale ne paraît pas contenir de pyrophosphatase, de phosphodiesterase ni de phytase.

---

## CHAPITRE VI.

---

### LA PHOSPHATASE URINAIRE DANS LA MALADIE DE PAGET (1)

---

Sir James PAGET a décrit en 1876 une maladie particulière du squelette qu'il appela ostéite déformante comportant un certain nombre de caractéristiques.

On trouve d'abord des symptômes cliniques : la maladie survient chez des sujets de plus de 40 ans. Des déformations multiples des os sont constatées : augmentation progressive du volume de la tête ; tibias gros et incurvés, épaissis, dessinant les jambes arquées en oméga ; diminution de la taille due au tassement vertébral d'où une cyphose nette. Ces déformations forment un ensemble souvent typique au premier coup d'œil. Elles sont souvent accompagnées de douleurs rhumatoïdes, intolérables, dues rarement à des compressions médullaires ou radiculaires, mais inconstantes. La température des segments des membres atteints est augmentée.

A côté de ces symptômes cliniques, on trouve des symptômes radiologiques, indispensables pour le diagnostic et qui sont expliqués par le double mécanisme de transformation osseuse dans cette maladie : la destruction osseuse avec décalcification et la reconstruction rapide, anarchique avec insuffisance de recalcification. Ces symptômes sont d'abord l'épaississement et l'élargissement de la corticale (hyperostose) ; ensuite, la modification de structure de la corticale avec transparence plus grande (ostéoporose).

L'association de destruction accélérée et de néoformation précipitée donne un aspect ouaté, nuageux, absolument spécifique et particulièrement net au niveau du crâne.

Complétant ce tableau, viennent s'ajouter des symptômes biologiques : le taux du calcium sanguin, la calciurie et la phosphorémie sont à peu près constamment normaux. Par contre, KAY en 1929 a montré l'augmentation considérable à 10, 15 fois et plus du taux de la phosphatase A<sub>1</sub> du Sérum.

L'évolution se fait sur de longues années. Elle ne met pas par elle-même les jours du malade en danger.

(1) Nous adressons à notre Camarade Pierre ROYER, interne des Hôpitaux de Paris, tous nos remerciements pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans la rédaction de ce chapitre.

Des complications peuvent survenir : fractures spontanées ; surdité fréquente par ostéite fibreuse du rocher ; démences de types variés ; surtout artériosclérose très fréquemment associée.

L'ignorance la plus complète règne sur la nature de la maladie. Sa cause n'est pas connue. L'anatomie pathologique ne nous a renseigné que grossièrement sur son mécanisme.

Le traitement, en conséquence, est assez réduit. Le calcium, la vitamine D, les rayons ultra-violets ont favorisé certaines rémissions. Les injections de parathormone soulagent parfois les douleurs très pénibles.

Devant l'hyperphosphatasémie aussi marquée, il nous a paru intéressant de rechercher si une partie de la phosphatase sérique n'était pas éliminée par l'urine et si d'autre part le taux d'élimination de la phosphatase urinaire n'était pas modifié.

Nous avons fait porter ces observations sur six sujets atteints de maladie de PAGET. Pour chacun de ces sujets nous avons déterminé l'activité phosphatasique du sérum selon BODANSKY et nous avons examiné l'activité phosphatasique de l'urine au point de vue des diastases A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>. Nous avons déterminé l'activité phosphatasique de l'urine en utilisant notre technique habituelle : mise en contact de l'urine et du  $\beta$ -glycérophosphate pendant 24 heures à 37°. Ici, comme nous avons voulu doser la phosphatase A<sub>1</sub> en même temps que l'A<sub>2</sub>, nous faisons deux séries parallèles d'essais : à pH 5,2 et à pH 9.

Au bout de 24 heures, nous refroidissons et nous dosons le phosphore et le glycérol par les méthodes décrites plus haut. Nous donnons pour la phosphatase sérique A<sub>1</sub> les chiffres en unités BODANSKY (pour un adulte normal la moyenne est de 1,5 à 4 unités) et pour les phosphatases A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> dans l'urine le nombre de milligrammes de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés.

#### OBSERVATION I. Mme REC...

##### *Urines de 24 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

65 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 0 mg.

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 13 mg.

#### OBSERVATION II. Mr. PRA...

##### *Urines de 24 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

32,5 unités BODANSKY,

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 0 mg. 5

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 11 mg.

OBSERVATION III. Mr. PRA...

*Urines émises à 7 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

32 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 0 mg.

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 10 mg. 5

OBSERVATION IV. Mme POU...

*Urines émises à 7 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

34 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 2 mg.

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 22 mg. 5

OBSERVATION V. Mme POU...

*Urines émises à 10 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

34 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 0 mg. 7

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 22 mg. 5

OBSERVATION VI. Mr. INC...

*Urines émises à 7 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

39 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 0 mg. 5

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 30 mg.

OBSERVATION VII. Mr. PRE...

*Urines émises à 10 heures*

Activité phosphatasique du sérum :

34,2 unités BODANSKY.

Activité phosphatasique de l'urine :

A<sub>1</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 2 mg. 5

A<sub>2</sub> — nombre de mg. de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> libérés : 22 mg.

L'examen de ces quelques chiffres nous permet de tirer les conclusions suivantes :

En aucun cas, chez les six sujets examinés, l'hyperphosphatasémie ne s'est accompagnée d'une présence notable de phosphatase A<sub>1</sub> dans l'urine et la quantité de phosphatase A<sub>2</sub> n'est pas différente de ce que nous avons retrouvé chez les sujets normaux, surtout si nous tenons compte de la grande irrégularité de l'élimination de la phosphatase urinaire.

---



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

---

Dans le but de doser la phosphatase urinaire, nous avons cherché si le  $\beta$ -glycérophosphate était un substrat convenable pour ces recherches.

I. — Quelques faits pouvaient laisser supposer qu'il existait une mutase des glycérophosphates. Cette diastase analogue à celle qui transforme réversiblement l'acide  $\beta$ -phosphoglycérique en  $\alpha$ , aurait isomérisé réversiblement le  $\beta$ -glycérophosphate en  $\alpha$ . Nous n'avons jamais pu déceler cette mutase dans un certain nombre de préparations d'origine végétale ou animale.

Nous n'avons pas mis en évidence de mutase dans :

- le liquide fermentaire de *Sterigmatocystis nigra* CRAMER.
- " " " " *Aspergillus orizae* COHN.
- " " " " *Mucor javanicus* WEHMER.
- la poudre d'Amande délipidée.
- l'émulsine d'Amandes douces.
- les Amandes fraîches.
- les amandes de noyaux de Pêches.
- l'Orge perlé et les semences de Pavot blanc.
- les feuilles fraîches d'Epinard.
- l'autolysat de rein de Porc.
- la pulpe placentaire.
- les hématies et le sérum humain.
- l'urine humaine.

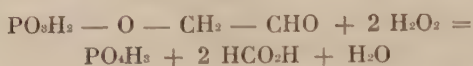
Tous ces essais négatifs ont été répétés avec la même préparation pour des réactions du milieu et des durées de contact variables.

Pour rechercher la mutase, nous avons dû mettre au point une technique appropriée : la mutase transformerait le  $\beta$ -glycérophosphate non oxydable par l'acide periodique en  $\alpha$ -glycérophosphate. Ce dernier est oxydé par l'acide periodique en aldéhyde formique et diosephosphate (ester mononorthophosphorique de l'aldéhyde glycolique).

Le diosephosphate est un ester infiniment plus fragile que le glycérophosphate ; le diosephosphate est partiellement déphosphorylé par les alcalis et très rapidement hydrolysé par les acides.

Nous avons cherché à doser l' $\alpha$ -glycérophosphate par transformation en diosephosphate dont nous libérons le phosphore par action des alcalis ou hydrolyse acide. Dans ces conditions,

la déphosphorylation du  $\beta$ -glycérophosphate associé est minime. Il est possible de procéder ainsi pour doser l' $\alpha$ -glycérophosphate dans les milieux complexes. Nous avons cependant pu mettre au point une technique encore plus précise : le diosephosphate est déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin ; cette réaction peut être formulée ainsi :



Nous avons pu caractériser et doser l'acide formique qui apparaît. En faisant réagir le peroxyde d'hydrogène sur 12 esters phosphoriques, nous avons constaté que seuls les esters possédant une fonction aldéhydique ou cétonique libre sont déphosphorylés d'une façon notable. Le  $\beta$ -glycérophosphate n'est pratiquement pas décomposé.

Après avoir vérifié notre technique sur des mélanges synthétiques analogues à ceux pouvant se présenter au cours de la recherche de la mutase, nous avons mis au point la technique suivante de recherche de mutase :

Mise en contact de la préparation fermentaire avec du  $\beta$ -glycérophosphate, si ce dernier s'isomérisé en  $\alpha$  nous le caractérisons de la façon suivante :

- a) élimination préalable du phosphore minéral libéré sous forme de phosphate de baryum.
- b) oxydation periodique de l' $\alpha$ -glycérophosphate en diosephosphate.
- c) déphosphorylation du diosephosphate par le peroxyde d'hydrogène alcalin.
- d) dosage de l'acide phosphorique formé.

Dans les 3 phases b), c) et d) de cette technique, le  $\beta$ -glycérophosphate ne libère que des quantités insignifiantes d'acide phosphorique de l'ordre de 3 p. 100.

II. — Nous avons pu montrer que l'on pouvait apprécier l'activité d'une phosphatase en la faisant réagir sur du  $\beta$ -glycérophosphate et dosant soit l'acide phosphorique libéré soit le glycérol mis en liberté, ce dernier étant titré par l'acide periodique.

L'urine normale renfermant des phosphates, nous avons espéré que le dosage du glycérol éviterait l'emploi d'un témoin ; mais nous nous sommes aperçus que l'urine normale renfermait des substances oxydables par l'acide periodique ; nous avons cherché à les éliminer d'une façon simple pour pouvoir y réussir. Nos essais montrent que ces substances réduisant l'acide periodique sont constituées pour la majeure partie par les glucides normaux de l'urine, glucides qui restent encore mal connus.

L'élimination des sucres par la baryte concentrée en milieu alcoolique concentré ne laisse en solution que les polyols ; cette élimination avait permis à FLEURY et FATOME de doser le glycérol dans des préparations biologiques d'origines variées.

En appliquant cette technique à l'urine nous avons constaté que tous les échantillons renfermaient une petite quantité de substances non éliminées par la baryte alcoolique et réduisant l'acide periodique. Ces corps se comportent donc comme des polyols.

III. — Nous avons donc apprécié l'activité phosphatasique de l'urine en dosant soit l'acide phosphorique, soit le glycérol libérés par hydrolyse du  $\beta$ -glycérophosphate. Il est toujours nécessaire de fixer par un essai-témoin la teneur de l'urine soit en phosphates, soit en substances réduisant l'acide periodique.

A l'aide de cette technique nous avons étudié l'activité phosphatasique urinaire. Toujours plus élevée chez l'homme que chez la femme, elle varie nettement au cours de la journée, l'urine du lever et celles après les repas sont les plus actives.

Nous nous sommes appliqués à fixer les caractéristiques de la phosphatase urinaire, nous avons relargué cette diastase en saturant l'urine de sulfate d'ammonium, nous avons obtenu, par dessiccation du précipité formé, des échantillon pulvérulents en partant de mélanges d'urines normales émises à la même heure. Toutes ces préparations présentent qualitativement les mêmes caractères, ceci quelle que soit l'heure d'émission de l'urine ou son origine : Homme — Femme — Sujet prostatectomisé ou urine prélevée par cystostomie.

Ces propriétés générales sont les suivantes :

- 1) pH optimum vers 5,2 avec comme substrats soit l' $\alpha$ , soit le  $\beta$ -glycérophosphate.
- 2) hydrolyse plus rapide du  $\beta$ -glycérophosphate que de l' $\alpha$ .
- 3) aucune activation par l'ion magnésium.
- 4) inhibition par le fluorure de sodium inversement proportionnelle à la concentration du substrat.

La phosphatase urinaire peut donc être rangée dans le groupe  $A_2$  de la classification des phosphatases.

Nos recherches montrent qu'il existe une phosphatase  $A_2$  dans toutes les urines normales. Il existe dans la prostate une phosphatase  $A_2$  présentant les mêmes caractéristiques que la phosphatase urinaire ; Il est vraisemblable que cette phosphatase passe soit directement, soit indirectement par le trajet sang-rein dans l'urine d'homme. Ceci expliquerait l'activité phosphatasique urinaire plus forte chez l'homme que chez la femme. Chez l'homme, la phosphatase normale urinaire serait ainsi mélangée à la phosphatase prostatique.

La phosphatase urinaire normale semble avoir pour origine la phosphatase  $A_2$  du sérum, nous avons vérifié que cette dernière avait un pH optimum de 5,2 et hydrolysait le  $\beta$ -glycérophosphate plus rapidement que l' $\alpha$ .

La phosphatase  $A_1$  du sérum est beaucoup plus active que la phosphatase  $A_2$  associée. Cette phosphatase  $A_1$ , à pH optimum en milieu alcalin, activée par les sels de magnésium, ne semble pas passer dans l'urine. Nos différents échantillons de phosphatase urinaire ne possèdent qu'une activité insignifiante en milieu alcalin ; l'addition d'un sel de magnésium n'élève pas l'activité infime à pH 8,2.

La phosphatase urinaire normale ne paraît pas contenir de pyrophosphatase, phosphodiesterase ou phytase.

Enfin, examinant quelques cas de maladie de PAGET, nous avons trouvé que l'hyperphosphatasémie ne s'accompagne pas de l'élimination de phosphatase  $A_1$  dans l'urine.

L'ensemble de ces recherches tend donc à confirmer l'existence d'une phosphatase urinaire normale à propriétés caractéristiques.

26 Février 1943.

Vu : *Le Doyen*,

A. DAMIENS.

Vu : *le Président de Thèse*,

H. HÉRISSEY.

Vu et permis d'imprimer,

*Le Recteur de l'Académie de Paris*,

GILBERT GIDEL.

---





## BIBLIOGRAPHIE

---

1. AMBERT (P.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1929.
2. AXMACHER (F.). — *Biochem. Z.*, 1932, **248**, 231.
3. BAILLY (Mlle M. C.). — *C. R.*, 1938, **206**, 1902.
4. BAILLY (O.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1919, **25**, 240.
5. BALINT (P.). — *Biochem. Z.*, 1934, **274**, 305.
6. BAMANN (E.) et GALL (H.). — *Biochem. Z.*, 1937, **293**, 1.
7. BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.
8. BAUMANN (E. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1924, **59**, 667.
9. BERNIER (R.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris 1910.
10. BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1933, **101**, 93.
11. CAVALIER (J.). — *C. R.*, 1898, **127**, 114.
12. CAVALIER (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1898, **19**, 883.
13. CAVALIER (J.) et PROST (E.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1940, **23**, 678.
14. COPAUX (H.). — *C. R.*, 1921, **173**, 656.
15. CORI (G. T.), COLOWICK (S. P.) et CORI (C. F.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, **123**, 375 et 1938, **124**, 543.
16. COURTOIS (J.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1932.
17. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1935, **17**, 1318.
18. COURTOIS (J.). — *Th. Doct. Sc. Phys.*, Paris, 1938.
19. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1938, **20**, 1359, 1376.
20. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1938, **20**, 1393.
21. COURTOIS (J.). — *Jl Pharm. Chim.*, 1939, **29**, 433.
22. COURTOIS (J.). — *Revue, Ann. des Ferment.*, 1941, 6, 1, et *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1941, **23**, 133.
23. COURTOIS (J.) et BIGET (P.). — *Ann. chim. Anal.*, 1942, **24**, 59.
24. COURTOIS (J.) et DENIS (P.). — *Enzymologia*, 1938, **5**, 288.
25. COURTOIS (J.) et MANOUVRIER (Mlle J.). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 342.
26. COURTOIS (J.) et RABATÉ (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1941, **23**, 184.
27. DEMUTH (F.). — *Biochem. Z.*, 1925, **159**, 415.
28. DE SAINT-STEBAN (G.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1922.
29. DMOCHOWSKI (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 956.
30. DMOCHOWSKI (A.) et ASSENHAYM (D.). — *Naturwissen*, 1935, **23**, 50.
31. DMOCHOWSKI (A.) et PRACOWITY (M.). — *Acta. Biol. Exptl. Warsaw*, 1937, **11**, 1112, d'après *Chem. abs.*, 1938, **32**, 7939.

32. ENKLEWITZ (M.) et LASKER (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **110**, 443.
33. EVERETT (M. R.), EDWARDS (B. G.) et SHEPPARD (F.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 11.
34. EVERETT (M. R.) et SHEPPARD (F.). — *J. Biol. Chem.*, 1932, **96**, 431.
35. FATOME (M.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1935.
36. FATOME (M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1936, **23**, 23.
37. FLEURY (P.) et AMBERT (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1930, **12**, 1255.
38. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Enzymologia*, 1938, **5**, 254.
39. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Ann. chim. anal.*, 1941, **23**, 117.
40. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1941, **8**, 69.
41. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1941, **8**, 75.
42. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1941, **8**, 397.
43. FLEURY (P.) et FATOME (M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1935, **21**, 257.
44. FLEURY (P.) et LANGE (J.). — *J. Pharm. Chim.*, 1933, **17**, 107, 196, 316, 409.
45. FLEURY (P.) et PARIS (C.). — *J. Pharm. Chim.*, 1933, **18**, 470.
46. FLEURY (P.) et SUTU (Z.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1926, **39**, 1716.
47. FLOOD (C. A.), GUTMAN (E. B.) et GUTMAN (A. B.). — *Amer. J. Physiol.*, 1937, **120**, 696.
48. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. D.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 159.
49. GODA (T.). — *Biochem. Z.*, 1938, **297**, 347.
50. GREENWALD (I.). — *Proceed. Soc. exper. Biol.*, 1929, **26**, 321.
51. GREENWALD (I.). — *J. Biol. Chem.*, 1930, **88**, 1 et 1930, **89**, 501.
52. GRIMBERT (L.) et BERNIER (R.). — *J. Pharm. Chim.*, 1909, **30**, 529.
53. HATANO (J.). — *Biochem. Z.*, 1925, **159**, 175.
54. HEINROD (G. W.) et LEVENE (P. A.). — *Biochem. Z.*, 1910, **29**, 33.
55. HÉRISSEY (H.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1899.
56. IWATSURU (R.) et NANJO (K.). — *Biochem. Z.*, 1939, **300**, 422.
57. JENNER (H. D.) et KAY (H. O.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.
58. KITAMURA (R.). — *J. Pharm. Soc. Japan.*, 1934, **54**, 1, **54**, 72 et 1937, **57**, 29.
59. KRAUT (H.) et PANTSCHENKO-JUREWICZ (W.). — *Biochem. Z.*, 1934, **275**, 114.
60. KUTSCHER (W.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **235**, 62.

61. KUTSCHER (W.) et PANY (J.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1930, **255**, 169.
62. KUTSCHER (W.) et WOLBERGS (H.). — *Naturwissen*, 1935, **23**, 558.
63. KUTSCHER (W.) et WÖRNER (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **238**, 275.
64. KUTSCHER (W.) et WÖRNER (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **239**, 109.
65. KUTSCHER (W.). et WUST (H.). — *Biochem. Z.*, 1941, **310**, 292.
66. LACHAUX (M.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1938.
67. LUNDSTEEN (E.) et VERMEHREN (E.). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 27.
68. MANDEL (J. A.) et NEUBERG (C.). — *Biochem. Z.*, 1915, **71**, 196.
69. MEILLÈRE (G.) et FLEURY (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1909, **67**, 343.
70. MEYERHOF (O.) et KIESSLING (W.). — *Biochem. Z.*, 1935, **276**, 239.
72. MEYERHOF (O.) et LOHMANN (K.). — *Biochem. Z.*, 1934, **271**, 89.
73. MEYERHOF (O.), LOHMANN (K.) et SCHUSTER (P.). — *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 301.
74. MEYERHOF (O.) et MAC EACHERN (D.). — *Biochem. Z.*, 1933, **260**, 417.
- 74 bis. MICHAELIS (L.) et MENTEN (Mlle L.). — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
75. MISSON (G.). — *Chem. Z.*, 1908, **32**, 633.
76. MURRAY (M. M.) et ASHLEY (S. E. R.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1938, **10**, 4.
77. NEUBERG (C.). — *Biochem. Z.*, 1918, **88**, 432.
78. NEUBERG (C.) et SCHWENK (E.). — *Biochem. Z.*, 1915, **71**, 114.
79. NICLOUX (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 890.
80. OBERHAUSER (F.) et HENSINGER (W.). — *Z. anorg. Chem.*, 1927, **160**, 366.
81. PARIS (C.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1935.
82. PFANKUCH (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 34.
83. PLIMMER (A.) et SCOTT (F. H.). — *J. Chem. Soc. London*, **93**, 1705.
84. POSTERNAK (S.). — *C. R.*, 1919, **168**, 1216.
85. ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol. France*, 1931, **13**, 841.
86. TOLLENS et ELSNER (H.). — *Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate Leipzig*, 1935.
87. UMEMO (M.). — *Biochem. Z.*, 1934, **231**, 317.
88. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.) et NONNENBRUCH (W.). — *Naturwissen* 1935, **23**, 164.
89. WOLBERGS (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **238**, 23.
-



# TABLE DES MATIÈRES.

Pages

## PREMIÈRE PARTIE.

### Recherche d'une Mutase des glycérophosphates.

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                                                                      | 9  |
| CHAPITRE I. — Mise au point d'une technique de Recherche..                                                              | 11 |
| A) <i>Dosage de l'<math>\alpha</math>-glycérophosphate par hydrolyse acide du diosephosphate.....</i>                   | 11 |
| B) <i>Dosage de l'<math>\alpha</math>-glycérophosphate par hydrolyse alcaline du diosephosphate.....</i>                | 12 |
| C) <i>Action du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin sur le diosephosphate et d'autres esters phosphoriques .....</i> | 16 |
| Action du peroxyde d'hydrogène alcalin sur divers esters .....                                                          | 17 |
| Etude détaillée de l'oxydation du diosephosphate                                                                        | 19 |
| a) <i>Vitesse de déphosphorylation.....</i>                                                                             | 19 |
| b) <i>Identification des produits de la réaction.</i>                                                                   | 20 |
| D) <i>Technique de recherche proprement dite.....</i>                                                                   | 22 |
| Conclusions du Chapitre I.....                                                                                          | 26 |
| CHAPITRE II. — Recherche de la Mutase.....                                                                              | 27 |
| A) <i>Préparations d'origine végétale.....</i>                                                                          | 27 |
| 1° <i>Liquide fermentaire de Sterigmatocystis nigra .....</i>                                                           | 27 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 2° Poudre d'Amande délipidée.....              | 28 |
| 3° Emulsine d'Amandes douces.....              | 29 |
| 4° Lait d'Amandes .....                        | 29 |
| 5° Amandes de noyaux de Pêches.....            | 29 |
| 6° Orge perlé .....                            | 31 |
| 7° Semences de Pavot blanc.....                | 31 |
| 8° Limbe de feuilles fraîches d'Epinard....    | 31 |
| B) <i>Préparations d'origine animale</i> ..... | 32 |
| 1° Autolysat de rein de Porc.....              | 32 |
| 2° Pulpe placentaire .....                     | 33 |
| 3° Hématies humaines et Sérum humain....       | 33 |
| 4° Urines humaines .....                       | 34 |
| Conclusions du Chapitre II.....                | 35 |

## DEUXIÈME PARTIE.

### Etude de la Phosphatase urinaire.

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| CHAPITRE I. — Historique.....                                | 37 |
| La phosphatase A <sub>1</sub> .....                          | 37 |
| La phosphatase A <sub>2</sub> .....                          | 38 |
| CHAPITRE II. — Action de l'acide periodique sur l'Urine..... | 42 |
| I. <i>Urine pure</i> .....                                   | 45 |
| II. <i>Action de divers défécants</i> .....                  | 46 |
| a) Acétate neutre de plomb.....                              | 46 |
| b) Eau de baryte .....                                       | 47 |
| c) Sels de mercure.....                                      | 47 |
| d) Cuivre et baryte.....                                     | 48 |
| e) Cadmium et baryte.....                                    | 48 |
| f) Alcool éthylique .....                                    | 48 |
| g) Elimination par la baryte alcoolique.....                 | 49 |
| Conclusions du Chapitre II.....                              | 50 |

|                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CHAPITRE III. — Technique de Mesure de l'activité phosphatase urinaire .....                             | 51  |
| I. <i>Dosage du phosphore</i> .....                                                                      | 54  |
| II. <i>Dosage du glycérol</i> .....                                                                      | 55  |
| <i>Dosage du phosphore par la méthode de Misson</i> ...                                                  | 58  |
| CHAPITRE IV. — Etude directe de la phosphatase urinaire...                                               | 60  |
| pH optimum .....                                                                                         | 60  |
| Influence de la conservation de l'urine.....                                                             | 61  |
| Elimination au cours de la journée.....                                                                  | 62  |
| Essais de purification de la phosphatase urinaire..                                                      | 65  |
| CHAPITRE V. — Propriétés générales de divers échantillons de phosphatase urinaire relarguée.....         | 71  |
| I. <i>pH optimum. — Action sur les <math>\alpha</math> et <math>\beta</math>-glycérophosphates</i> ..... | 71  |
| II. <i>Activation par les sels de Magnésium</i> .....                                                    | 79  |
| III. <i>Inhibition par le fluorure de Sodium</i> .....                                                   | 81  |
| IV. <i>Influence de la concentration en substrat sur l'activité phosphatase</i> .....                    | 82  |
| V. <i>Action de la phosphatase urinaire sur d'autres dérivés phosphoriques</i> .....                     | 87  |
| Conclusions du Chapitre V.....                                                                           | 89  |
| CHAPITRE VI. — La phosphatase urinaire dans la maladie de Paget .....                                    | 90  |
| <i>Conclusions générales</i> .....                                                                       | 95  |
| BIBLIOGRAPHIE. ....                                                                                      | 101 |

---





